



**Universidade de Aveiro**  
**Ano 2012**

Departamento de Química

**Mariana Isabel  
Cordeiro Raposo**

**Nº Mec.: 40070**

## **Subtipos funcionais de células T em Esclerose Sistémica**





**Universidade de Aveiro**  
**Ano 2012**

Departamento de Química

**Mariana Isabel  
Cordeiro Raposo**

**Nº Mec.: 40070**

## **Subtipos funcionais de células T em Esclerose Sistémica**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, com especialização em Bioquímica Clínica, realizada sob a orientação científica do Doutor Artur Augusto Paiva, do Centro de Histocompatibilidade do Centro, e da Doutora Maria do Rosário Gonçalves Reis Marques Domingues, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.



Dedico este trabalho aos meus pais pelo apoio dado ao longo de todos estes anos



## **O júri**

presidente

**Dr. Rui Miguel Pinheiro Vitorino**

Investigador auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutor Luís Miguel Borrego**

Professor auxiliar do Departamento de Imunologia da Universidade Nova de Lisboa

**Doutor Artur Augusto Paiva**

Assessor do Centro de Histocompatibilidade de Coimbra

**Prof. Doutora Maria do Rosário Gonçalves Reis Marques Domingues**

Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro





## **Agradecimentos**

Inicio os meus agradecimentos manifestando o meu muito obrigado ao meu orientador Dr. Artur Augusto Paiva por me ter dado esta oportunidade de estagiar em ambiente empresarial, no Centro de Histocompatibilidade de Coimbra, e pela ajuda e orientação científica dada na realização da minha dissertação.

De igual modo agradeço à minha orientadora, Professora Maria do Rosário Domingues, pelo apoio dado ao longo da realização deste trabalho, pelas críticas construtivas, pelas sugestões e pelos conselhos dados sobretudo nos meus momentos de maior desânimo.

Ao grupo de trabalho da zona de citometria de fluxo deixo também o meu obrigado, em especial ao Tiago Carvalheiro que tanto tempo disponibilizou para me orientar neste trabalho, quer a nível laboratorial, quer a nível de conhecimento científico, e com o qual aprendi bastante.

Estou também agradecida às minhas colegas de laboratório, Cláudia, Sara, Sílvia e Vanessa, pela companhia, pelas risadas e pelos bons momentos que passamos juntas.

Por último, mas não menos importante, agradeço aos meus pais, irmão e ao meu namorado Tiago, pelo incansável apoio ao longo de todos os anos de estudo na Universidade, por me terem aturado nos dias em que estava rabugenta e por me terem compreendido e ajudado a ultrapassar todos os meus obstáculos.



**Palavras-chave**

Doença autoimune, Esclerose Sistémica, Th17, Tc17, IL-17

**Resumo**

A Esclerose Sistémica é uma doença reumática autoimune do tecido conjuntivo, caracterizada por anormalidades do sistema vascular e imune, que levam à fibrose da pele e órgãos internos. A fisiopatologia desta doença é ainda desconhecida. Contudo existe a hipótese de que os linfócitos Th17/Tc17 e que as células que se caracterizam pela expressão de CXCR5 estejam de algum modo envolvidas nesta doença, pelo facto de elas terem um papel importante em outras doenças autoimunes. Deste modo, o presente trabalho teve com objetivo quantificar e caracterizar funcionalmente as células Th(c)17, Th(c)1 e os subtipos Th17 CXCR5+ e Th1 CXCR5+ no sangue periférico de doentes com Esclerose Sistémica.

Para tal, o sangue periférico de 43 doentes com Esclerose Sistémica e de 20 pessoas saudáveis foi colhido e os linfócitos T foram inicialmente estimulados *in vitro* para se quantificar a produção das suas citocinas. Seguiu-se um protocolo de permeabilização intracitoplasmática de forma a se analisar separadamente a expressão intracelular das citocinas IL-17, IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  nas diferentes subpopulações de linfócitos em estudo. Os doentes com Esclerose Sistémica foram divididos consoante o subtipo da doença e consoante o tempo de duração da doença desde o diagnóstico.

Os resultados obtidos demonstraram que não existiam diferenças na frequência de células Th17 e Tc17 entre os grupos estudados. No entanto, a frequência destas células a produzir IL-2 e TNF $\alpha$  é maior nos doentes com Esclerose Sistémica. Para além disso verificou-se que com aumento da duração da doença em estudo, há um aumento da frequência das células Th1 e Tc1 a produzir TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ . Verificou-se ainda que a frequência dos subtipos Th1 CXCR5+ a produzir as citocinas IL-2 e TNF $\alpha$  parece distinguir os dois subtipos de Esclerose Sistémica.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que as células Th17 e as células Th1 estão, do ponto de vista funcional, alteradas em SSc, o que aponta para o seu envolvimento na fisiopatologia e/ou progressão da doença.



**Keywords**

Autoimmune disease, Systemic Sclerosis, Th17, Tc17, IL-17

**Abstract**

Systemic Sclerosis is an autoimmune rheumatic disease of the connective tissue, characterized by vascular and immune system abnormalities, leading to fibrosis of the skin and internal organs. The pathophysiology of this disease is still unknown. However there is a hypothesis that Th17 and Tc17 lymphocytes and cells that are characterized by expression of CXCR5 are somehow involved in this disease since they have an important role in other autoimmune diseases. Thus, the present study aimed to quantify and functionally characterize Th(c)17 and Th(c)1 cells and Th17 CXCR5+ and Th1 CXCR5+ subtypes in peripheral blood of patients with Systemic Sclerosis.

To this end, peripheral blood from 43 patients with Systemic Sclerosis and 20 healthy individuals was collected and T lymphocytes were stimulated in vitro to quantify their cytokine production. This was followed by an intracytoplasmic permeabilization protocol in order to separately analyze the intracellular expression of IL-17, IL-2, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  in the different T cell subpopulations in analysis. Patients with Systemic Sclerosis were divided depending on the disease subtype and the disease duration since diagnosis.

The results showed that there were no differences in the frequency of Th17 and Tc17 cells between groups. However, the frequency of these cells producing IL-2 and TNF $\alpha$  is greater in patients with systemic sclerosis. Furthermore it was found an increase frequency of TNF $\alpha$ - and IFN $\gamma$ -producing Th1 and Tc1 cells, with the increasing duration of disease. It was further found that the frequency of CXCR5 + Th1 subtypes producing IL-2 and TNF $\alpha$  cytokines can distinguish the two subtypes of systemic sclerosis.

The present results suggest that Th17 cells and Th1 cells are at the functional point of view altered in SSc, which points to their involvement in the pathophysiology and/or disease progression.



## Índice:

<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1. SISTEMA IMUNITÁRIO .....	3
1.1. <i>Células do sistema imunitário</i> .....	3
1.1.1. Linfócitos ou células linfóides .....	3
1.1.2. Monócitos, macrófagos e células dendríticas .....	5
1.1.3. Granulócitos .....	6
1.2. <i>Órgãos linfóides</i> .....	6
1.2.1. Órgãos linfóides primários .....	7
1.2.2. Órgãos linfóides secundários .....	7
1.3. <i>A resposta imune</i> .....	8
1.3.1. Citocinas: mediadores solúveis da resposta imunológica .....	8
1.3.2. Imunidade inata ou natural .....	9
1.3.3. Imunidade adquirida ou adaptativa .....	9
2. LINFÓCITOS T .....	10
2.1. <i>Maturação dos linfócitos T</i> .....	11
2.2. <i>Ativação dos linfócitos T</i> .....	11
2.3. <i>Diferentes tipos e subtipos de linfócitos T</i> .....	12
2.3.1. Diferenciação e função dos linfócitos T CD4 .....	12
2.3.1.1. Linfócitos Th17 – um terceiro e novo tipo de células Th .....	13
2.3.1.1.1. Diferenciação dos linfócitos Th17 .....	14
<b>2.3.1.1.1.a. Citocinas e fatores de transcrição envolvidos na regulação da diferenciação</b> .....	14
<b>2.3.1.1.1.b. Células apresentadoras de antígenos envolvidas na diferenciação</b> .....	16
2.3.1.1.2. Características dos linfócitos Th17 .....	17
<b>2.3.1.1.2.a. Citocinas expressas pelas células Th17</b> .....	17
<b>2.3.1.1.2.b. Recetores expressos pelas células Th17 e sua função</b> .....	18
2.3.1.1.3. Plasticidade das células Th17 .....	19
2.3.1.2. Linfócitos T foliculares auxiliares ou Tfh .....	20
2.3.1.2.1. Características fenotípicas e funcionais dos linfócitos Tfh .....	20
2.3.1.2.2. Diferenciação dos linfócitos Tfh .....	21
2.3.1.2.3. Relação dos linfócitos Tfh com outros subtipos de linfócitos T .....	22
2.3.1.2.4. Linfócitos Tfh do sangue periférico .....	22
2.3.2. Diferenciação e função dos linfócitos T CD8 .....	23
2.3.2.1. Linfócitos Tc17 – um terceiro e novo subtipo de células Tc .....	23
2.3.3. Linfócitos T reguladores .....	24
3. DOENÇAS AUTOIMUNES .....	25
3.1. <i>Papel dos linfócitos Th17 e Tc17 nas doenças autoimunes</i> .....	26
3.2. <i>Papel dos linfócitos Tfh na doenças autoimunes</i> .....	28
3.3. <i>Esclerose Sistémica</i> .....	28
3.3.1. Alterações patológicas características .....	29
3.3.2. Classificação dos diferentes tipos de esclerose sistémica .....	30
3.3.3. Etiologia da doença .....	30
3.3.3.1. Hipóteses sobre a sua patologia .....	31
3.3.4. Patogenia da Esclerose Sistémica .....	32

3.3.4.1. Disfunção vascular .....	32
3.3.4.2. Desregulação imune .....	33
3.3.4.3. Fibrose – o passo final da fisiopatologia da SSc .....	34
3.3.5. Tratamento da patologia .....	35
3.4. Células Th17, Tc17 e Tfh na Esclerose Sistémica .....	36
4. OBJETIVOS .....	38
<b>II. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
1. POPULAÇÃO EM ESTUDO.....	41
2. QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS CÉLULAS TH(C)17 E TH(C)1 NO SANGUE PERIFÉRICO.....	42
2.1. Estimulação <i>in vitro</i> de linfócitos T.....	42
2.2. Marcação intracitoplasmática das citocinas em estudo .....	42
3. AQUISIÇÃO DAS AMOSTRAS NO CITÓMETRO DE FLUXO E ANÁLISE DOS RESULTADOS .....	44
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	44
<b>III. RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
1. FREQUÊNCIA DOS LINFÓCITOS TH17 E Tc17 NO SANGUE PERIFÉRICO DE DOENTES COM ESCLEROSE SISTÉMICA .....	47
2. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS CÉLULAS TH17, TH1, Tc17 E Tc1 NO SANGUE PERIFÉRICO DE DOENTES COM ESCLEROSE SISTÉMICA .....	47
2.1. Caracterização funcional das células Th17 e Tc17.....	47
2.2. Caracterização funcional das células Th1 e Tc1.....	51
3. FREQUÊNCIA DOS LINFÓCITOS TH17 CXCR5 <sup>+</sup> E TH1 CXCR5 <sup>+</sup> NO SANGUE PERIFÉRICO DE DOENTES COM ESCLEROSE SISTÉMICA .....	51
4. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS CÉLULAS TH17 CXCR5 <sup>+</sup> , TH17 CXCR5 <sup>-</sup> , TH1 CXCR5 <sup>+</sup> E TH1 CXCR5 <sup>-</sup> NO SANGUE PERIFÉRICO DE DOENTES COM ESCLEROSE SISTÉMICA E NO GRUPO CONTROLO .....	51
4.1. Caracterização funcional das células Th1 CXCR5 <sup>+</sup> e Th1 CXCR5 <sup>-</sup> .....	55
<b>IV. DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
1. FREQUÊNCIA DOS LINFÓCITOS TH17 E Tc17 NO SANGUE PERIFÉRICO DE DOENTES COM ESCLEROSE SISTÉMICA .....	59
2. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS CÉLULAS TH17 E Tc17 NO SANGUE PERIFÉRICO DE DOENTES COM SSc.....	60
3. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS CÉLULAS TH1 E Tc1 NO SANGUE PERIFÉRICO DE DOENTES COM ESCLEROSE SISTÉMICA .....	61
4. FREQUÊNCIA DOS LINFÓCITOS TH17 CXCR5 <sup>+</sup> E TH1 CXCR5 <sup>+</sup> NO SANGUE PERIFÉRICO DE DOENTES COM ESCLEROSE SISTÉMICA .....	62
5. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS CÉLULAS TH1 CXCR5 <sup>+</sup> E TH1 CXCR5 <sup>-</sup> .....	63
<b>V. CONCLUSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>69</b>



## Índice de Figuras:

<b>Figura 1.</b> Hematopoiese, demonstrando os diferente tipos de células constituintes do sangue a que a célula estaminal da origem (adaptado de [2]).	4
<b>Figura 2.</b> Regulação da diferenciação das células Th17 e citocinas por elas produzidas. As interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-21 e IL-6 favorecem a expressão do fator de transcrição RORC2 através do fator de transcrição STAT3, induzindo a diferenciação das células Th17. As citocinas IL-4 e IL-12+IFN $\gamma$ suprimem o RORC2 pois favorecem os fatores de transcrição GATA-3 e T-bet, respetivamente, inibindo assim a diferenciação das células Th17. A expressão de RORC2 induz a expressão de IL-17. O aumento da expressão de RORC2 induz a expressão das citocinas IL-26 e IL-22 e dos recetores CCR6, CCR4, IL-23R e CD161. O papel do TGF- $\beta$ ainda está por se esclarecer (adaptado de [42]).	16
<b>Figura 3.</b> Interação das células dendríticas com as células Th17 e Th1 (adaptado de [45]).	17
<b>Figura 4.</b> Níveis séricos de IL-17 em pacientes com SSc, comparados com pessoas normais (adaptado de [137]).	36
<b>Figura 5.</b> Variação da produção de IL-17 ao longo do tempo de duração de SSc [137].	36
<b>Figura 6.</b> Representação ilustrativa da identificação dos subtipos de células Th17 e Th1, Th1CXCR5 <sup>+</sup> e Th1CXCR5 <sup>-</sup> e expressão da citocina TNF $\alpha$ por cada um desses subtipos utilizando a seguinte combinação de anticorpos monoclonais: anti-CD3, anti-CD8, anti-CXCR5, anti-IL-17 e anti-TNF $\alpha$ .	44
<b>Figura 7.</b> Representação gráfica da média da frequência (%) dos linfócitos Th17, Tc17, Th1 e Tc1 a produzir as citocinas TNF $\alpha$ , IL-2 e IFN $\gamma$ no sangue periférico de doentes com $\leq 1$ ano de duração da SSc (Grupo 1), entre 1 e 10 anos de duração da SSc (grupo2) e com $> 10$ anos de duração da SSc (grupo 3). As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o <i>p-value</i> $< 0,05$ : <sup>d</sup> Grupo 1 versus Grupo 2 <sup>e</sup> Grupo 1 versus Grupo 3 <sup>f</sup> Grupo 1 versus Controlo <sup>g</sup> Grupo 2 versus Controlo <sup>h</sup> Grupo 3 versus Controlo.	50
<b>Figura 8.</b> Representação gráfica da quantidade das citocinas TNF $\alpha$ , IL-2 e IFN $\gamma$ expressa pelos linfócitos Th17, Th1, Tc17 e Tc1 no sangue periférico de doentes com $\leq 1$ ano de duração da SSc (Grupo 1), entre 1 e 10 anos de duração da SSc (grupo2) e com $> 10$ anos de duração da SSc (grupo 3). As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando <i>p-value</i> $< 0,05$ : <sup>d</sup> Grupo 1 versus Grupo 2 <sup>e</sup> Grupo 1 versus Grupo 3 <sup>f</sup> Grupo 1 versus Controlo	50
<b>Figura 9.</b> Representação gráfica da mediana da frequência (%) dos linfócitos Th17 / Th1 CXCR5 <sup>+</sup> (positivo) e Th17 / Th1 CXCR5 <sup>-</sup> (negativo) a produzir as citocinas TNF $\alpha$ , IL-2 e IFN $\gamma$ no sangue periférico de indivíduos saudáveis (grupo controlo). As diferenças foram consideradas significativas (*) quando o <i>p-value</i> $< 0,05$ .	52
<b>Figura 10.</b> Representação gráfica da média da frequência (%) dos linfócitos Th1 CXCR5 <sup>+</sup> e Th1 CXCR5 <sup>-</sup> a produzir as citocinas TNF $\alpha$ , IL-2 e IFN $\gamma$ no sangue periférico de doentes com $\leq 1$ ano de duração da SSc (Grupo 1), entre 1 e 10 anos de duração da SSc (grupo2) e com $> 10$ anos de duração da SSc (grupo 3). As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o <i>p value</i> $< 0,05$ :	54
<b>Figura 11.</b> Representação gráfica da média da quantidade das citocinas TNF $\alpha$ , IL-2 e IFN $\gamma$ expressa pelos linfócitos Th1 CXCR5 <sup>+</sup> e Th1 CXCR5 <sup>-</sup> no sangue periférico de doentes com $\leq 1$ ano de duração da SSc (Grupo 1), entre 1 e 10 anos de duração da SSc (grupo2) e com $> 10$ anos de duração da SSc (grupo 3). As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando <i>p value</i> $< 0,05$ :	54

## Índice de Tabelas:

<b>Tabela 1.</b> Características clínicas dos doentes com SSc. IECA, inibidor da enzima de conversão da angiotensina.....	41
<b>Tabela 2.</b> Especificidade, clone e origem dos anticorpos monoclonais utilizados no início da marcação intracitoplasmática das citocinas em estudo. ....	42
<b>Tabela 3.</b> Especificidade, clone e origem dos anticorpos monoclonais utilizados após aplicação da solução 2 do Kit Intraprep .....	43
<b>Tabela 4.</b> Frequência dos linfócitos T CD4, T CD8, Th17 e Tc17 no sangue periférico nos diferentes subtipos de SSc, e em função do tempo da doença após o seu diagnóstico, e no grupo controlo. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão da frequência de células Th17 do total de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> , e de células Tc17 do total de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> no sangue periférico, e das MFI da citocina IL-17 para cada um dos subtipos. Grupo 1: grupo de doentes com menos de 1 ano de duração da SSc. Grupo 2: grupo de doentes com duração da SSc entre 1 e 10 anos. Grupo 3, grupo de doentes com mais de 10 anos de duração da SSc.....	48
<b>Tabela 5.</b> Frequência (%) de células (Th17, Tc17, Th1 e Tc1) produtoras de citocinas e quantidade de citocina expressa por célula (MFI) nos diferentes subtipos da doença Esclerose Sistémica e grupo controlo, após estimulação <i>in vitro</i> dos linfócitos T. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. ....	49
<b>Tabela 6.</b> Frequência dos linfócitos Th17 CXCR5 <sup>+</sup> e Th1 CXCR5 <sup>+</sup> no sangue periférico dos diferentes subtipos e grupos de duração da doença Esclerose Sistémica com o grupo controlo. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. % Th17, frequência de células Th17 CXCR5 <sup>+</sup> do total de células Th17 do sangue periférico. % Th1, frequência de células Th1 CXCR5 <sup>+</sup> do total de células Th1 do sangue periférico. Grupo 1: grupo de doentes com menos de 1 ano de duração da SSc. Grupo 2: grupo de doentes com duração da SSc entre 1 e 10 anos. Grupo 3, grupo de doentes com mais de 10 anos de duração da SSc.....	52
<b>Tabela 7.</b> Frequência (%) de células Th1 CXCR5 <sup>+</sup> e Th1 CXCR5 <sup>-</sup> produtoras de citocinas e quantidade de citocina expressa por célula (MFI) nos diferentes subtipos da doença Esclerose Sistémica e Controlos, após estímulo <i>in vitro</i> dos linfócitos T. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. ....	53

### Lista de Abreviaturas:

APC	<i>Antigen-Presenting Cell</i>
Bcl-6	<i>B cell lymphoma 6</i>
BLIMP-1	<i>B lymphocyte-induced maturation protein 1</i>
CD $\chi$	<i>cluster of differentiation <math>\chi</math></i>
CXCL13	<i>CXC-chemokine ligand 13</i>
CXCR5	<i>CXC-chemokine receptor 5</i>
ICOS	<i>inducible co-stimulator</i>
IFN	<i>interferon</i>
IL- $\chi$	<i>interleukin <math>\chi</math></i>
IL- $\chi$ R	<i>interleukin <math>\chi</math> receptor</i>
NK	<i>natural killer (cell)</i>
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PD-1	<i>programmed cell death-1</i>
PMA	<i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
ROR	<i>retinoid-related orphan nuclear receptor</i>
SSc	<i>Systemic Sclerosis</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
Tc	<i>T cytotoxic (cell)</i>
TCR	<i>T-cell-receptor</i>
Tfh	<i>T follicular helper cells</i>
Th	<i>T helper (cell)</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>



# I. Introdução



## **1. SISTEMA IMUNITÁRIO**

O nosso organismo dispõe de um importante sistema imunitário (ou imunológico) que é um sistema de defesa que tem como função a proteção contra microrganismos patogênicos, sendo também fundamental para o equilíbrio homeostático do organismo. Ele é constituído por vários órgãos e tecidos diferentes, com características específicas, que se encontram ao longo do corpo e que têm a capacidade de produzir uma grande variedade de células e moléculas que atuam conjuntamente num trabalho dinâmico, tornando-se capazes de reconhecer e eliminar microrganismos estranhos ao organismo [1, 2].

### **1.1. Células do sistema imunitário**

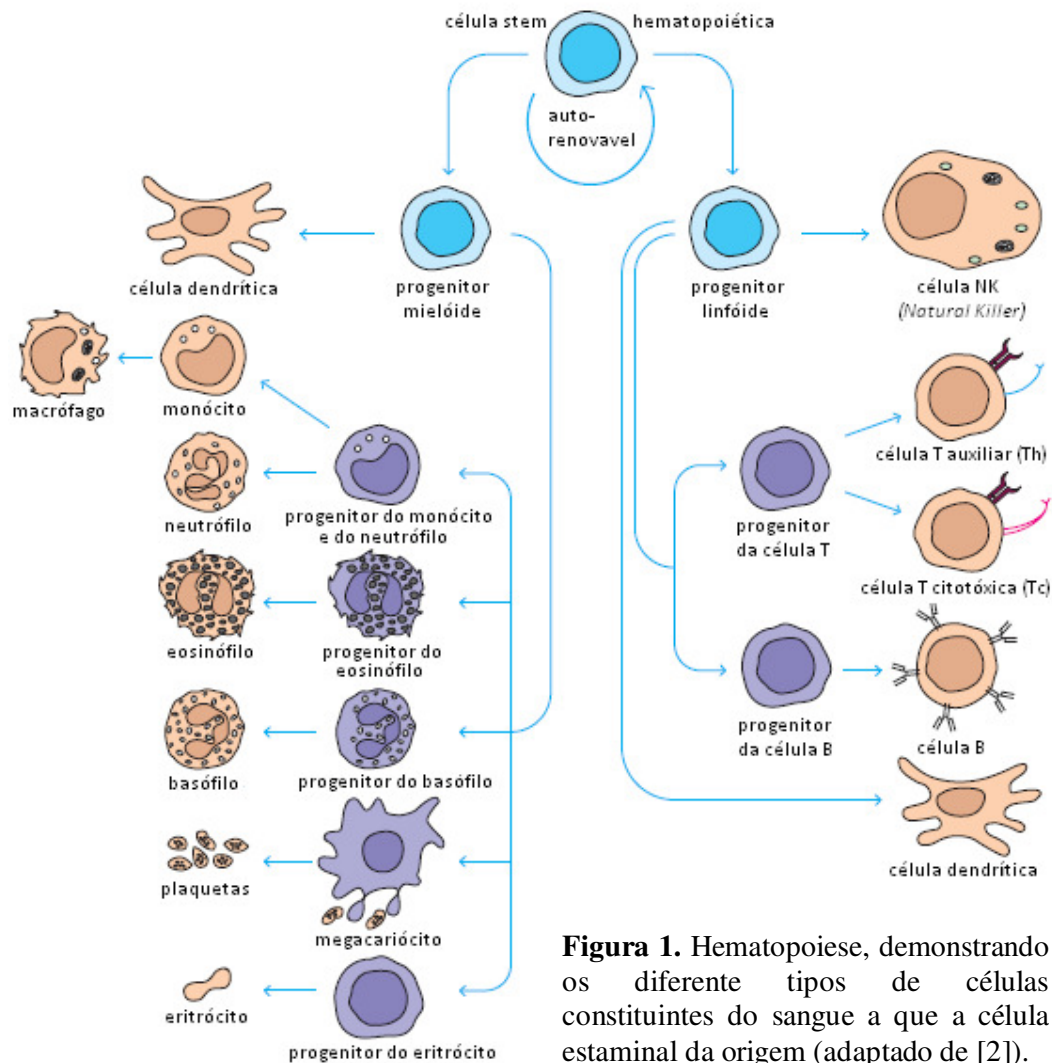
Todas as células sanguíneas derivam das células estaminais num processo designado de hematopoiese que ocorre, após o nascimento, na medula óssea [3]. As células estaminais têm uma capacidade de autorrenovação e são consideradas como multipotentes por se diferenciarem nos diferentes tipos de células do sangue [2, 4, 5]. Estas agrupam-se em duas grandes linhagens celulares (Figura 1): a linhagem mieloide, que origina os granulócitos e os monócitos (tipos de leucócitos), os eritroblastos (precursores dos eritrócitos) e os megacariócitos (que originam as plaquetas); a linhagem linfoide, que origina os linfócitos T e B e as células NK (do inglês *Natural Killer*) (tipos de leucócitos). As células dendríticas parecem se originar a partir dos progenitores de ambas as linhagens. A diferenciação destas células depende dos fatores de crescimento e de citocinas presentes no seu meio envolvente [1, 6].

As células do sistema imunitário compõem um grupo designado de leucócitos. Dentro deste grupo de células, os linfócitos são os que ocupam um papel central nas respostas imunológicas pois são eles que lhe conferem especificidade. Os restantes tipos celulares que constituem os leucócitos têm como papel fundamental fagocitar e destruir microrganismos, apresentar antígenos e secretar citocinas [1, 2].

#### **1.1.1. Linfócitos ou células linfóides**

Os linfócitos constituem 20% - 40% dos leucócitos e circulam continuamente entre o sangue e a linfa sendo capazes de migrar até aos órgãos linfóides. Eles podem ser divididos em três grandes populações: as células T, as células B e as células NK [2].

Os linfócitos B realizam a sua maturação na medula óssea e distinguem-se dos outros linfócitos por possuírem na sua membrana plasmática um recetor característico designado de recetor da célula B. Este recetor é constituído por uma proteína designada de imunoglobulina que está ligada à membrana plasmática e que é capaz de se ligar a antígenos específicos livres [2, 5].



**Figura 1.** Hematopoiese, demonstrando os diferentes tipos de células constituintes do sangue a que a célula estaminal da origem (adaptado de [2]).

Os linfócitos T realizam a sua maturação no timo e possuem também um recetor característico à superfície da membrana plasmática, designado de recetor da célula T, ou TCR (do inglês *T-Cell-Receptor*). Este recetor encontra-se associado a uma molécula de sinalização designada de CD (*cluster of differentiation*) 3, e por isso é comum ser designado de complexo TCR-CD3. Os recetores da célula T reconhecem antígenos que sofreram um processamento e que sejam apresentados à célula T associados a moléculas



do complexo major de histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*), moléculas que são expressas na superfície das células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês *Antigen-Presenting Cell*), que incluem os macrófagos, as células dendríticas e as células B [2, 3].

As células T e B que nunca interagiram com um antígeno são referidas como células *naïve*. Dentro dos linfócitos T existem diferentes tipos de células *naïve*, como são as células T CD4 e as células T CD8. Após o contacto com o antígeno, e na presença de certas citocinas, os diferentes tipos de linfócitos *naïve* proliferam e diferenciam-se em dois tipos de células: células efetoras, que têm como função eliminar o antígeno; células de memória, que são inativas mas com capacidade de resposta a nova exposição do mesmo antígeno. As células efetoras dos linfócitos B são designadas de plasmócitos. Estas células são produtoras da forma solúvel da imunoglobulina (anticorpos), proteína que se liga aos antígenos sinalizando-os para destruição por outras células do sistema imunológico. [1-3]. Mais à frente neste trabalho irá ser feita uma descrição mais alargada dos linfócitos T, já que o trabalho desenvolvido no âmbito do mestrado foca uma subpopulação desta célula.

Por último, as células NK têm uma função citotóxica, destruindo, através de um contacto direto, as células infetadas. Uma vez ligada à célula alvo, estas células libertam o conteúdo dos seus grânulos, principalmente perforina e granzima. As células NK também secretam citocinas e quimiocinas que regulam e orientam a resposta imune [7, 8]. Esta ação é principalmente realizada pelo subgrupo de células NK CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup>, enquanto que a destruição direta das células é maioritariamente exercida por outro subgrupo de células NK, as CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> [9].

### 1.1.2. Monócitos, macrófagos e células dendríticas

Os monócitos, também designados de fagócitos mononucleares, desenvolvem-se na medula óssea, circulam depois na corrente sanguínea e finalmente migram para os tecidos onde se diferenciam em macrófagos ou em certos tipos de células dendríticas [2, 4].

Os macrófagos são ativados por uma variedade de estímulos que ocorrem durante a resposta imune. Quando o monócito evolui para macrófago, existe um aumento da sua capacidade fagocítica e da secreção de vários fatores solúveis com funções imunorreguladoras. Os macrófagos ativados também passam a expressar uma maior

quantidade de moléculas MHC de classe II, permitindo que eles funcionem mais eficazmente como células apresentadoras de antígenos, ativando os linfócitos T [2-4].

As células dendríticas na sua forma imatura são especializadas em captar os antígenos por fagocitose ou endocitose, sendo o antígeno depois processado. Em resposta a vários estímulos elas tornam-se maduras e especializadas em apresentar o antígeno processado às células T. Existem quatro tipos de células dendríticas, mas todas têm a capacidade de expressar elevadas quantidades de moléculas MHC de classe II, sendo as APC mais eficientes na apresentação do antígeno aos linfócitos T [10].

### 1.1.3. Granulócitos

Os granulócitos são classificados em três tipos dependendo da sua morfologia e das características de coloração citoplasmática: neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Os neutrófilos são os primeiros a chegar ao local da infecção e têm uma elevada capacidade fagocítica. O movimento e a circulação dos neutrófilos para os tecidos envolvem vários passos e é designado de diapedese. Os eosinófilos são também células fagocíticas, apesar de esta sua capacidade ser mais fraca. Eles atuam libertando o conteúdo dos grânulos para o meio extracelular, sendo a sua ação principalmente contra parasitas. Ao contrário das duas células anteriores, os basófilos não têm capacidade fagocítica. Eles atuam pela libertação de substâncias quimiotáticas ativas a partir dos seus grânulos citoplasmáticos, estando principalmente envolvidos em respostas alérgicas [1, 2, 4].

## 1.2. Órgãos linfóides

Os órgãos que constituem o sistema imunitário podem ser classificados, do ponto de vista funcional, em dois grandes grupos: os órgãos linfóides primários, os quais proporcionam microambientes essenciais para o desenvolvimento e maturação dos linfócitos; os órgãos linfóides secundários, os quais proporcionam eficientemente o encontro entre os linfócitos *naïve* e o antígeno para o qual são específicos.

Após os linfócitos maduros serem gerados nos órgãos linfóides primários, eles circulam no sangue e no sistema linfático. O sistema linfático consiste numa rede de gânglios linfáticos ligados por vasos linfáticos onde circula a linfa. Esta origina-se a partir do fluido intersticial tecidual que entra nos capilares linfáticos [1, 2].

### 1.2.1. Órgãos linfóides primários

Os órgãos classificados como linfóides primários incluem a medula óssea e o timo, pois é onde maturam as células B e as células T, respetivamente [1, 2].

A medula óssea caracteriza-se por ser um tecido mole e adiposo que preenche a cavidade interna de vários ossos. Nela estão presentes as células da linhagem hematopoiética mas também células do tecido conectivo e células do estroma, que incluem os adipócitos, fibroblastos, células endoteliais e macrófagos. As células hematopoiéticas localizam-se na porção mais periférica da cavidade medular (junto ao osso); as células mais diferenciadas encontram-se ao nível central da cavidade medular [5, 11].

O timo é uma glândula que se situa na parte superior do tórax acima do coração. Ele consiste em dois lobos que se unem em frente à traqueia. Cada lobo é envolto de uma cápsula de tecido conjuntivo que os divide em vários lóbulos. Cada lóbulo, por sua vez, é organizado em dois compartimentos: o córtex, que é uma zona escura por possuir bastantes timócitos (células T imaturas); a medula, que é uma zona clara por ser fracamente povoada por timócitos. Ambas as zonas possuem ainda células epiteliais, células dendríticas e macrófagos que contribuem para o crescimento e maturação dos timócitos [4, 11].

### 1.2.2. Órgãos linfóides secundários

Os gânglios linfáticos, o baço e os tecidos linfóides associados às mucosas são considerados os órgãos linfóides secundários, pois é neles que os linfócitos maduros conseguem interagir eficientemente com o antígeno [2].

Os gânglios linfáticos, ou nódulos linfáticos, são pequenos órgãos com a forma de um feijão. A linfa rica em antígenos circula no interior destes órgãos onde é filtrada, isto é, qualquer antígeno trazido pela mesma é captado pelas células fagocíticas e células dendríticas presentes nos nódulos linfáticos. Morfologicamente um gânglio linfático pode ser dividido em três regiões: o córtex, o paracórtex e a medula [1, 3, 4]. O córtex, a região mais externa, contém essencialmente linfócitos B, macrófagos e células dendríticas organizados nos folículos primários que, como resposta a um estímulo antigénico, se tornam maiores formando os folículos secundários. Estes últimos caracterizam-se por possuir um centro germinativo, onde os linfócitos B são estimulados por antígenos e células T auxiliares a gerarem células de memória. O paracórtex, abaixo do córtex, contém essencialmente linfócitos T e células dendríticas interdigitantes. A medula é a camada mais

interna dos gânglios e é escassamente povoada pelas células linfocíticas, possuindo contudo muitas células plasmáticas a secretar anticorpos [1, 11]

O baço é um órgão grande e ovoide localizado na cavidade abdominal esquerda. Enquanto que os nódulos linfáticos captam o antígeno vindo de tecidos e são suprimidos por veias linfáticas, o baço é especializado em filtrar e captar antígenos presentes no sangue, sendo suprimidos pela artéria esplénica. [1, 5, 11]. Os tecidos linfóides associados às mucosas estão localizados, tal como o nome indica, junto às mucosas, e têm a capacidade de endocitar um antígeno a partir do lúmen. Exemplos são as membranas mucosas que revestem o sistema digestivo e respiratório [2].

Depois de os linfócitos maturarem corretamente eles passam a designar-se de imunocompetentes, isto é, passam a ter capacidade de produzir uma resposta imune específica.

### **1.3. A resposta imune**

A imunidade define-se com todos os mecanismos de defesa que o nosso organismo dispõe para a proteção de doenças infecciosas. Este processo de reação do sistema imunológico pode dividir-se em dois tipos de resposta: a resposta imunológica inata ou natural e a resposta imunológica adquirida ou adaptativa. Estas duas respostas são mediadas pelas células do sistema imune e por citocinas, e estão inter-relacionadas, sendo a expressão do sistema imunológico [1, 2].

#### **1.3.1. Citocinas: mediadores solúveis da resposta imunológica**

O desenvolvimento de uma resposta imune, quer inata quer adaptativa, efetiva necessita, para além das células envolvidas, de um grupo de proteínas que se designam de citocinas e que estabelecem a comunicação entre as células que desenvolvem a resposta. As citocinas são péptidos ou glicoproteínas secretadas essencialmente pelas células do sistema imune como resposta a um dado estímulo. Elas ligam-se a recetores específicos localizados na membrana celular das células alvo [2, 3].

Se as citocinas são secretadas por leucócitos e/ou atuam em outros leucócitos elas são designadas de interleucinas (IL). Estas são classificadas pelo respetivo número, mas existem interleucinas que são conhecidas pelo próprio nome. As citocinas são designadas de quimiocinas quando elas exercem uma ação quimiotática. Apesar de a maior parte das

células do sistema imune conseguir secretar citocinas, os principais produtores são as células T auxiliares e as APC [2, 3].

### **1.3.2. Imunidade inata ou natural**

A imunidade inata, também designada de natural ou não-específica compreende essencialmente quatro tipos de barreiras: anatómicas, fisiológicas, fagocíticas e inflamatórias [2, 6, 12]. As barreiras anatómicas e físicas que previnem a entrada dos organismos patogénicos são a primeira linha de defesa contra a infeção. Dentro desta categoria temos, por exemplo, a pele que, desde que íntegra, é praticamente impenetrável, Como barreiras fisiológicas temos, por exemplo, a temperatura e o pH [2, 3, 6].

A fagocitose é um dos principais mecanismos de suporte da imunidade inata. Ela define-se com o processo pelo qual o material particulado, com bactérias, é ingerido pelas células fagocíticas e, depois, destruído e neutralizado. Os principais tipos de células fagocíticas são os monócitos, neutrófilos e macrófagos. Estas células possuem movimentos ameboides que lhes permite deslocar para o local da infeção como resposta a estímulos químicos de atracção desencadeados pelas quimiocinas. Este processo de migração, designado de diapedese, é facilitado pelo aparecimento de moléculas de adesão, quer nas células fagocíticas, quer nas células epiteliais [1, 3].

As células dendríticas são também capazes de fagocitar microrganismos e a sua estimulação é um passo indispensável para se iniciar uma resposta adaptativa. Temos ainda os mastócitos, que são também importantes na imunidade inata pois produzem mediadores inflamatórios que têm um papel importante no recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório. Alguns linfócitos podem ter funções citotóxicas contra células-alvo não necessitando de qualquer tipo de sensibilização. Exemplos são as células NK e os linfócitos T  $\gamma\delta$  [1, 2].

### **1.3.3. Imunidade adquirida ou adaptativa**

Quando a eliminação e neutralização dos antígenos estranhos ao organismo não foi conseguida pela imunidade inata, passa a desenvolver-se uma imunidade adquirida (ou adaptativa) onde existe a capacidade de um reconhecimento e de uma eliminação seletiva e específica dos antígenos desconhecidos [1].

Este tipo de imunidade exhibe essencialmente quatro características: especificidade antigénica, pois os anticorpos conseguem distinguir pequenas diferenças entre os

antigénios; diversidade, que advém do sistema imune ser capaz de reconhecer biliões de estruturas únicas nos diferentes microrganismos; memória imunológica, que permite que, num segundo contacto com o mesmo antigénio, a resposta imune seja mais rápida e mais intensa; reconhecimento do próprio e do não-próprio, pois o sistema imune no seu estado normal apenas responde aos antigénios que lhe são estranhos [1, 2].

A imunidade adquirida pode se dividir em dois tipos que a caracterizam: a imunidade humoral, onde a resposta imunológica é mediada pelos anticorpos produzidos pelos linfócitos B; a imunidade celular, onde a resposta imunológica é mediada principalmente pelos linfócitos T que têm a capacidade de reconhecer e lisar células portadoras de antigénios estranhos ao nosso organismo [2, 3]. A ativação da imunidade humoral e da imunidade celular do sistema imune necessita de citocinas que são produzidas maioritariamente pelos linfócitos T auxiliares. Os linfócitos são ativados pelas células apresentadoras de antigénios, após o reconhecimento do antigénio pelo TCR que lhe é apresentado através das moléculas de MHC das APC. A migração dos linfócitos ativados para o local da infeção depende da expressão de moléculas de adesão, que nas células endoteliais, quer nos próprios linfócitos, as quais são induzidas por citocinas específicas [1, 2].

É de se notar que a imunidade adaptativa não é independente da inata, nem vice-versa. Pelo contrário, estes dois tipos de imunidade interatuam como um sistema cooperativo. Por exemplo, muitos dos fatores solúveis produzidos na resposta adquirida controlam ações das células envolvidas na resposta inata, como são as células fagocíticas. Com papéis que podem mesmo sobrepor-se, estes dois sistemas trabalham conjuntamente formando uma barreira efetiva contra a infeção [1, 2, 13].

Tendo em conta que o trabalho desenvolvido no âmbito do mestrado se baseia em subpopulações de células T, irá ser feita, seguidamente, uma descrição mais alargada dos linfócitos T e das suas subpopulações.

## 2. LINFÓCITOS T

Como vimos anteriormente, os linfócitos T pertencem a um grupo dos leucócitos e são os principais efetores da imunidade celular. Eles distinguem-se de outros linfócitos pela presença do complexo TCR-CD3 à superfície da membrana, e são designados por linfócitos T por realizarem a sua maturação no timo.

## 2.1. Maturação dos linfócitos T

As células progenitoras dos linfócitos T migram da medula óssea para o timo onde vão sofrer maturação. Após a entrada destas células no córtex do timo, elas começam a proliferar dando origem a uma grande população de timócitos (linfócitos T imaturos). Estas células são normalmente designadas de duplamente negativas por ainda não possuírem os marcadores CD4 e CD8 característicos de subpopulações dos linfócitos T. Após reações complexas onde há a formação da cadeia  $\beta$  do TCR, estas células passam a expressar à sua superfície um pré-TCR. Subsequentemente expressam também os marcadores CD4 e CD8, passando a designarem-se de células duplamente positivas. Por fim ocorre o rearranjo dos genes da cadeia  $\alpha$  do TCR. Existe uma pequena subpopulação de linfócitos T que se caracteriza por possuir um TCR constituído pelas cadeias  $\gamma$  e  $\delta$  e que são células duplamente negativas; elas são designadas de linfócitos T CD3  $\gamma\delta$  [2-4, 14].

As células duplamente positivas podem então passar por um processo de seleção que se divide em duas fases: a seleção positiva, que permite a sobrevivência apenas dos timócitos cujo TCR é capaz de ligar e reconhecer moléculas do MHC próprias; a seleção negativa, que elimina os timócitos que tenham uma afinidade demasiado elevada com as moléculas do MHC ou com os antígenos apresentados pelas moléculas do MHC [2, 14].

Os timócitos duplamente positivos que expressam o complexo TCR-CD3 e que sobrevivem à seleção tímica desenvolvem-se depois em timócitos CD4<sup>+</sup> e em timócitos CD8<sup>+</sup>. Estes timócitos sofrem uma nova seleção negativa e vão, por fim, para a corrente sanguínea, onde se passam a designar de linfócitos T *naïve*, isto é, linfócitos que nunca interagiram com um antígeno. Existem essencialmente dois tipos de linfócitos T *naïve*: os linfócitos T CD4, que se caracterizam pela expressão da molécula membrana CD4 e que apenas reconhecem antígenos ligados às moléculas de MHC classe II; e os linfócitos T CD8, que se caracterizam pela expressão da molécula membrana CD8 e que reconhecem apenas os antígenos ligados às moléculas de MHC classe I [2, 14].

## 2.2. Ativação dos linfócitos T

A ativação dos linfócitos T *naïve* é essencial para que eles possam vir a desenvolver uma resposta. A interação do complexo TCR-CD3, presente tanto nos linfócitos CD4 como nos linfócitos CD8, com as moléculas de MHC classe II e MHC classe I, respetivamente, é o sinal de ativação primário que confere especificidade à resposta do linfócito T. No

entanto as células T *naïve* necessitam de mais do que um sinal para a sua ativação, sinais estes denominados de acessórios. Exemplos são os transmitidos pelos co-recetores CD4 e CD8 e os transmitidos pelo recetor CD28, que se liga à proteína B7-1 ou B7-2 das células APC. Estes sinais levam a que a célula T induza a transcrição da citocina IL-2 e a transcrição da cadeia  $\alpha$  (o CD25) do recetor desta citocina. Esta cadeia vai-se ligar às cadeias  $\beta$  e  $\gamma$  desse recetor, formando então o recetor de IL-2 de alta afinidade [2, 3, 15].

Em síntese, são necessários três sinais para a ativação dos linfócitos T: ligação do TCR-CD3 ao complexo MHC-antigénio; ligação do CD28 a B7-1 ou B7-2; ligação de IL-2 ao seu recetor. Caso não exista um destes sinais os linfócitos podem ficar num estado de anergia que se caracteriza por uma ausência de resposta a estímulos externos.

### 2.3. Diferentes tipos e subtipos de linfócitos T

Como resultado da ativação, os linfócitos T *naïve* que reconheceram o antigénio sofrem um processo de expansão clonal e dão origem, por diferenciação, a linfócitos T de memória e a linfócitos T efetores. Esta proliferação é promovida principalmente pela citocina IL-2 produzida pelos próprios linfócitos em divisão (ação autócrina) [1-3].

Os linfócitos T efetores são células ativadas e realizam funções específicas, que dependem do tipo de célula que lhe deu origem. Os linfócitos T CD4 efetores têm como função essencial ajudar outras células a desempenhar as suas funções, sendo por isso comumente designados de linfócitos T auxiliares (Th, do inglês *T helper*). Os linfócitos T CD8 ativados desempenham funções efetoras mais diretas, sendo também designados de linfócitos T citotóxicos (Tc, do inglês *T cytotoxic*) [1-3].

Os linfócitos T de memória são células *resting* mas com capacidade de resposta a nova exposição do mesmo antigénio. Estas células possuem um tempo de vida muito maior e respondem mais rapidamente ao mesmo antigénio num segundo contacto com o mesmo, gerando uma resposta secundária [1-3].

#### 2.3.1. Diferenciação e função dos linfócitos T CD4

Após a ativação dos linfócitos T CD4 (ou Th), que ocorre, como vimos, pela apresentação do antigénio pelas APC através das moléculas de MHC de classe II, estes diferenciam-se, sob a influência de sinais de polarização e fatores de transcrição, numa das duas principais subpopulações seguintes: linfócitos Th1 ou linfócitos Th2. Estas



subpopulações estão bem definidas e distinguem-se pelo padrão de citocinas que segregam que determina, em grande parte, a sua função [1, 16]

Os linfócitos Th1 originam-se como resposta à produção de IL-12 e interferões (IFN, do inglês *interferon*) pelas células dendríticas e pelas células NK [17-19] que ativam os fatores de transcrição T-bet (do inglês, *T-box-expressed-in-T-cells*) e STAT-4 (do inglês, *Signal Transducer and Activator of Transcription*) presentes nestas células [20, 21]. As células Th1 caracterizam-se por produzirem essencialmente IFN- $\gamma$ , entre outras citocinas como a IL-2 e o fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumor necrosis factor*) [16-18]. Elas têm como função, quer pela ativação dos macrófagos quer pela ação do IFN- $\gamma$ , mediar a proteção contra bactérias intracelulares e vírus [20, 22], estando essencialmente envolvidas na imunidade celular [23, 24]. No entanto estes linfócitos parecem também estar envolvidos em doenças autoimunes [25].

Os linfócitos Th2 originam-se na presença de IL-4 e na ausência de IL-12 [18] e pela ativação dos fatores de transcrição STAT-6 e GATA (da sequência Guanina-Adenina-Timina-Adenina) 3 [19, 21]. Estas células caracterizam-se pela produção de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, mas não de IFN- $\gamma$  [16, 17, 21]. Elas desenvolvem uma proteção contra parasitas extracelulares [20] e promovem a produção de anticorpos pelos linfócitos B e as respostas mediadas por eosinófilos e mastócitos [22], estando assim envolvidas essencialmente na imunidade humoral [23, 24]. Contudo os linfócitos Th2 estão também associados ao desenrolar de inflamações alérgicas e à asma [25].

#### 2.3.1.1. Linfócitos Th17 – um terceiro e novo tipo de células Th

A descoberta de um terceiro subtipo de células Th, designadas como Th17, ocorreu recentemente, no ano 2005, a partir de modelos de ratinhos. Estas células são consideradas distintas das células Th1 e Th2 não só pelo seu perfil de citocinas efetoras mas também pelo seu aparente desenvolvimento independente dessas células [26]. Apesar de a sua identificação ter ocorrido primeiramente no ratinho, estas células estão também presentes nos humanos. No entanto as características fenotípicas e funcionais bem como os mecanismos responsáveis para o seu desenvolvimento parecem ser diferentes entre estas duas espécies, sendo mais complexo em células humanas [21, 27]. De facto, vários princípios inicialmente propostos para os modelos de ratinhos foram amplamente aceites entre os investigadores, mas no que toca às células Th17 dos humanos, muitas das questões

mais simples são ainda contestadas [28]. Seguidamente irá ser referida a diferenciação e as características fenotípicas das células Th17 humanas; um resumo sobre estes tópicos pode ser visto na Figura 2.

#### 2.3.1.1.1. Diferenciação dos linfócitos Th17

Apesar do conhecimento das células Th17 ter surgido a partir de modelos de ratos, estudos recentes, embora ainda algo contraditórios, têm demonstrado que os mecanismos de diferenciação das células Th17 humanas são bem diferente de que aqueles que ocorrem nos ratinhos [21, 26]. No entanto tudo é ainda muito especulativo.

##### 2.3.1.1.1.a. Citocinas e fatores de transcrição envolvidos na regulação da diferenciação

A interleucina-1 $\beta$  foi demonstrada como sendo uma citocina importante na diferenciação das células Th17 nos humanos. Além disso a IL-6 e a IL-23 parecem favorecer bastante a diferenciação destas células na presença de IL-1 $\beta$ , enquanto sozinhas apenas induzem a formação de uma pequena frequência de células Th17 [29-31]. Contudo o papel da citocina IL-23 na diferenciação destas células ainda não é bem claro, pois outros grupos descobriram que esta citocina não possui nenhum efeito para o desenvolvimento das Th17 [32], ou que é apenas importante para a sobrevivência das mesmas [27]. Também a citocina IL-21 parece de algum modo favorecer a diferenciação dos linfócitos Th17, tendo um papel autócrino nesta célula [33]. Relativamente à citocina IL-2 ainda não existe consenso sobre a sua ação ao nível da diferenciação destas células. Enquanto que alguns investigadores demonstram que ela parece não afetar de nenhum modo a diferenciação das células Th17 [29, 30], outros demonstram que a adição de IL-2 favorece a produção de IL-17 pelas células Th17 [34, 35].

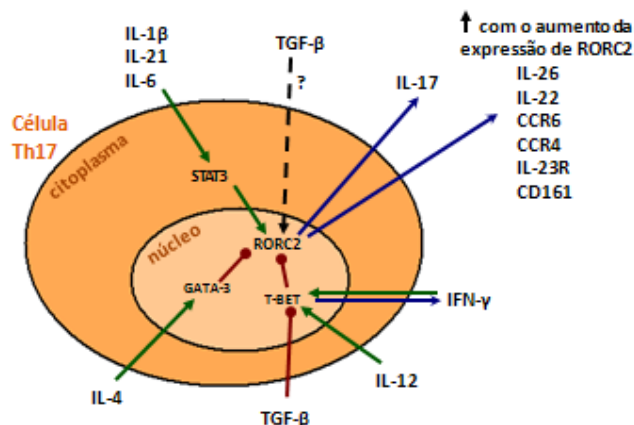
Relativamente ao fator de crescimento transformante (TGF, do inglês *transforming growth factor*)  $\beta$ , a contradição que existe entre os investigadores é maior do que para as citocinas anteriores [17]. Estudos iniciais ao nível das células Th17 demonstraram que, ao contrário do que acontece nos ratinhos, o TGF- $\beta$  não era necessário para a produção de IL-17 pelas células Th17 humanas [29, 30, 32]. Por exemplo, Acosta Roldriguez *et al.* demonstraram que as células Th17 humanas se originam a partir de células T *naïve* CD4 pela presença de IL-1 $\beta$  e IL-6, enquanto que a adição de TGF- $\beta$  inibe a sua diferenciação

[30]. Contudo, outros trabalhos publicados depois deste vieram evidenciar que, tal como no rato, o TGF- $\beta$  é de facto necessário para a diferenciação das células Th17 humanas [31, 33, 34].

As células Th1 e Th2 são conhecidas por se antagonizar uma à outra. Também as citocinas por elas produzidas foram demonstradas em diversos estudos como inibindo a diferenciação das células Th17, quer em ratos quer em humanos [26, 27, 29, 30, 36]. A citocina IL-17, no entanto, não parece inibir a diferenciação das células Th1 e Th2 ou fá-lo de um modo muito fraco, e assim as células Th1 e Th2 geralmente dominam as células Th17 [37]. Foi contudo notado que o TGF- $\beta$  tem a capacidade de suprimir a produção das citocinas IFN- $\gamma$  e a IL-4. Isto demonstra que o TGF- $\beta$  poderá ter um papel importante na diferenciação das células Th17 favorecendo indiretamente a diferenciação dessas células pela inibição do desenvolvimento das células Th1 e Th2 [28, 38].

Nos ratos foi descoberto que existem fatores de transcrição críticos para a diferenciação das células Th17, tal como o *retinoid-related orphan nuclear receptor* (ROR)  $\gamma$ t [39]. A subfamília do ROR humano consiste em três membros: RORA, RORB e RORC. Este último membro existe em duas isoformas: RORC1 e RORC2. A homologia na sequência do ROR $\gamma$ t e do RORC2 veio sugerir que o RORC2 é o fator de transcrição chave para a diferenciação das células humanas Th17, apesar de ele não ser exclusivo destas células [29, 31, 34, 40]. Este fator parece ser induzido pelo TGF- $\beta$ , sugerindo mais uma vez um papel importante desta proteína na diferenciação das células Th17 [40]. Outros estudos indicam que também a IL-21 ou o IL-6 são necessários para este favorecimento [33].

Yang *et al.* propuseram que um outro fator de transcrição, em combinação com o RORC2, poderá estar também envolvido no desenvolvimento das células Th17 já que o RORC2 por si só não é suficiente para induzir grandes quantidades de IL-17 [33, 35]. Apesar de o conhecimento acerca de outros fatores de transcrição envolvidos na diferenciação das células Th17 ser pequeno, parece que o fator de transcrição STAT-3 está também envolvido nesta função. Esta constatação baseou-se em estudos onde pacientes com síndrome de hiper-IgE que possuem mutações dominantes autossómicas no gene *STAT3* demonstravam uma deficiência na diferenciação das células Th17 [41].

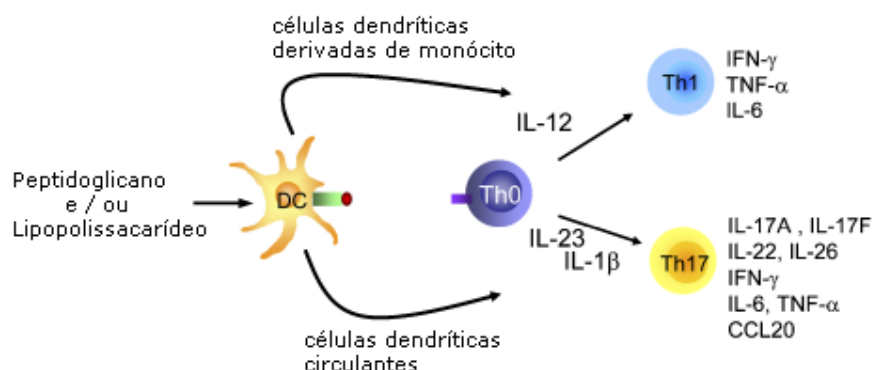


**Figura 2.** Regulação da diferenciação das células Th17 e citocinas por elas produzidas. As interleucinas IL-1β, IL-21 e IL-6 favorecem a expressão do fator de transcrição RORC2 através do fator de transcrição STAT3, induzindo a diferenciação das células Th17. As citocinas IL-4 e IL-12+IFN-γ suprimem o RORC2 pois favorecem os fatores de transcrição GATA-3 e T-bet, respectivamente, inibindo assim a diferenciação das células Th17. A expressão de RORC2 induz a expressão de IL-17. O aumento da expressão de RORC2 induz a expressão das citocinas IL-26 e IL-22 e dos receptores CCR6, CCR4, IL-23R e CD161. O papel do TGF-β ainda está por se esclarecer (adaptado de [42]).

#### 2.3.1.1.1.b. Células apresentadoras de antígenos envolvidas na diferenciação

Como vimos, as APC desempenham um papel essencial no controlo das respostas imunes, pois elas secretam citocinas e apresentam o antígeno às células T CD4 que as leva a diferenciarem-se em linhagens distintas [42].

A produção das diferentes citocinas essenciais para a diferenciação das células Th17 é também promovida pelas células APC ativadas. Acosta-Rodriguez *et al.*, demonstraram que os monócitos ativados por lipopolissacarídeos, e especialmente aqueles também ativados por peptidoglicano, são os mais eficientes na indução da diferenciação das células Th17, pois eles produzem grandes quantidades de IL-1β e de IL-6 como resposta a essa molécula. Viram ainda que as células dendríticas circulantes são também capazes de induzir a diferenciação das células em questão, especialmente quando estimuladas por peptidoglicano. Pelo contrário, as células dendríticas derivadas de monócitos não induzem esta diferenciação pois produzem essencialmente IL-12, uma citocina inibidora da diferenciação das células Th17 [30, 43]. Também Benwell *et al.* demonstraram que a diferenciação das células Th17 é favorecida por célula dendríticas ativadas por lipopolissacarídeos [44]. A interação das células dendríticas com estas células pode ser vista na Figura 3.



**Figura 3.** Interação das células dendríticas com as células Th17 e Th1 (adaptado de [45])

#### 2.3.1.1.2. Características dos linfócitos Th17

A caracterização dos marcadores específicos e das citocinas que definem as células Th17 humanas é essencial para que se possa identificar e localizar essas células nos tecidos durante a inflamação [45]. Exemplos destes são descritos seguidamente.

##### 2.3.1.1.2.a. Citocinas expressas pelas células Th17

As células Th17 caracterizam-se essencialmente pela produção de interleucina 17 (IL-17), e daí o nome destas células. A citocina IL-17, também conhecida como IL-17A, é uma glicoproteína de aproximadamente 20 kDa (155 aminoácidos) pertencente a uma família de seis citocinas conhecidas como IL-17A a IL-17F [46]. Ela tem como recetor alvo o recetor de IL-17 (IL-17R), uma proteína transmembranar do tipo I que tem uma ampla distribuição nos tecidos [22]. A sua produção é bastante elevada quando as citocinas TGF-β, IL-23 e as citocinas pró-inflamatórias IL-1β, IL-6 e TNF-α, bem como o fator de transcrição RORC2 participam na sua indução. As células Th17 também expressam a citocina IL-17F para além da IL-17A; estas duas citocinas homodimericas encerram uma homologia de 55% dos aminoácidos e possuem o mesmo recetor, sendo ambas reguladas por mecanismos similares [47, 48]. A expressão de IL-17F está menos associada ao RORC do que a expressão de IL-17A [31]. No entanto ambas as citocinas, mas de forma mais intensa a IL-17A, são importantes mediadoras da inflamação nos tecidos, induzem o recrutamento e a ativação dos neutrófilos, e estes, por sua vez, o recrutamento das células Th17 [49], e desencadeiam a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias por

várias células como células epiteliais, células endoteliais e macrófagos, criando-se uma ligação entre a resposta inata e a adquirida [20, 22, 28, 46].

Embora a IL-17 seja a citocina marcante das células Th17, estas células também produzem outras citocinas com carácter inflamatório, que podem desempenhar um papel importante em determinadas doenças se produzidas em excesso [28, 50]. Elas incluem a IL-6, IL-10 [31], IL-21, IL-22, IL-26, o TNF- $\alpha$  e a quimiocina CCL20 [27, 29, 30, 32, 51].

Cada uma das citocinas associadas com a célula Th17 é regulada de uma forma específica. Isto sugere que as citocinas que promovem o desenvolvimento das células Th17 controlam não só a quantidade de IL-17 produzida mas também modulam qualitativamente e quantitativamente o perfil global de citocinas produzidas por estas células. [31, 33].

#### **2.3.1.1.2.b. Recetores expressos pelas células Th17 e sua função**

A presença de recetores de quimiocinas na superfície das células T é bastante importante na medida em que são eles que medeiam o tráfico dessas células ativadas para os tecidos lesados. Para além disso, cada subtipo de célula T expressa tipicamente um padrão único de recetores de quimiocinas criando-se assim uma forma de se identificar os diversos subgrupos de células T [28].

Diversos estudos têm demonstrado que as células Th17 de memória e *naïve*, quer humanas quer do rato, expressam preferencialmente o recetor CCR6, recetor da quimiocina CCL20 [20, 27, 30, 52]. Este recetor tem demonstrado desempenhar um importante papel no recrutamento de células T em muitas doenças inflamatórias associadas com a citocina IL-17 [28, 43]. No entanto, nem todas as células que expressam CCR6 são células Th17. Dentro da população CCR6<sup>+</sup>, as células que expressam também CCR4 são de facto as células Th17 clássicas, isto é, aquelas que expressam IL-17, mas as que expressam o recetor CXCR3 além do CCR6 são células do tipo Th1 ou então células duplamente positivas (células capazes de secretar IL-17 e IFN- $\gamma$ , como veremos mais à frente). A maior parte da expressão de RORC2 ocorre na população CCR6<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> [20, 32, 45].

As células Th17 expressam também o recetor da citocina IL-23 (IL-23R), cuja quantidade é sete vezes maior do que o presente nas células Th1. A sua expressão é inibida pelo IFN- $\gamma$  [26, 29] e favorecida pelas citocinas que participam na diferenciação das células Th17, inclusive o seu próprio agonista IL-23 [21, 31]. Como vimos, parece que a

ativação deste recetor após o contacto com o seu ligando esteja envolvida apenas na sobrevivência destas células [27].

Num estudo feito por Cosmi *et al.*, foi demonstrado que as células Th17 humanas expressam na sua superfície o CD161 [51]. Estes investigadores descobriram que as células humanas produtoras de IL-17 podem originar-se a partir de células T precursoras  $CD4^+CD161^+$  caso estas células sejam ativadas na presença de IL-1 $\beta$  e IL-23 e na ausência aparente de TGF- $\beta$ . Foi proposto que a sua expressão pode ter um papel crucial na modulação da expansão das células Th17 [53], ou que permite a migração transendotelial das células Th17 efectoras para os tecidos [18]. Apesar do significado da expressão de CD161 pelas células Th17 de memória ou ativadas ainda não estar claro, o CD161, em conjunto com o CCR6, podem representar marcadores importantes para a deteção e isolamento das células Th17 humanas [17, 18].

#### 2.3.1.1.3. Plasticidade das células Th17

Vimos até agora que as células Th17 produzem essencialmente interleucina-17 e não produzem a citocina IFN- $\gamma$  característica das células Th1. Contudo vários estudos realizados vieram demonstrar que existem algumas células Th17 que são capazes de produzir tanto IL-17 como IFN- $\gamma$ , células classificadas como “Th17/Th1” ou como células duplamente positivas (IFN- $\gamma^+$  IL-17 $^+$ ) [20, 27, 32, 54], e que as células Th17 podem mesmo originar células do tipo Th1 quando estão na presença de IL-12 [27]. Estas observações levaram a concluir que as células Th17 podem possuir uma capacidade de se converter em células Th1, possuindo plasticidade [55].

O desenvolvimento das células IFN- $\gamma^+$  IL-17 $^+$  é inibido na presença de TGF- $\beta$ , havendo apenas indução das células IL-17 $^+$  IFN- $\gamma^-$  principalmente na presença das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-23 [17]. Annuziato *et al.* vieram evidenciar que estas células, quando expandidas *in vitro*, possuem, tal como as células Th17, expressão de IL-23R, CCR6, e o fator de transcrição RORC. Ambos os tipos de células demonstraram ainda uma excelente capacidade de ajudar as células B na produção de IgM, IgG e IgA, mas não IgE, uma baixa capacidade proliferativa e um baixo potencial citotóxico [27, 43]. Não existem dados que clarifiquem o papel específico destas células duplamente positivas; contudo tanto o IFN- $\gamma$  como a IL-17 são importantes mediadores de inflamação [28].

Para além da capacidade das células Th17 se poderem converter nas células descritas anteriormente, também parece existir plasticidade entre as células Th17 e as células T reguladoras. Estas, estimuladas na presença de IL-6, podem ser induzidas a produzir IL-17, sugerindo que as células T reguladoras maduras podem dar origem a células do tipo Th17 [56].

#### 2.3.1.2. Linfócitos T auxiliares foliculares ou Tfh

Como vimos anteriormente, as respostas imunológicas mediadas por anticorpos são largamente dependentes da ajuda fornecida pelos linfócitos T CD4. Para além destes linfócitos produzirem, após ativados, citocinas que ajudam na ativação destas respostas, eles são também fundamentais na formação dos centros germinais pela estimulação dos linfócitos B.

De entre os diversos subtipos de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, tornou-se claro que os que se caracterizam pela presença do recetor de quimiocina 5 do tipo CXC (CXCR5, *CXC-chemokine receptor 5*) são importantes para a formação dos folículos com linfócitos B nos órgãos linfoides secundários. Após a interação do recetor CXCR5 com o seu ligando CXCL13 (*CXC-chemokine ligand 13*) que é produzido pelas células foliculares [57], essas células vão para os centros germinais dos órgãos linfoides secundários, onde promovem a diferenciação dos linfócitos B em células B de memória e células plasmáticas [58, 59]. Devido à sua localização (folículos linfoides secundários) e função, estas células foram designadas de células T auxiliares foliculares (Tfh, *T follicular helper cells*) [60, 61].

##### 2.3.1.2.1. Características fenotípicas e funcionais dos linfócitos Tfh

Para além do recetor CXCR5, os linfócitos Tfh expressam várias outras moléculas que não só ajudam na sua identificação, como também desempenham funções importante na sua interação com os linfócitos B.

O recetor ICOS (do inglês *inducible co-stimulator*) é uma das moléculas mais frequentemente expressa por estas células, e o nível de expressão desta molécula está diretamente relacionada com a quantidade de citocina IL-10 que as células Tfh produzem. Este par de moléculas tem um papel importante no suporte da diferenciação e do desenvolvimento das células B nos centros germinais [59, 62]. Os linfócitos Tfh expressam também a molécula PD-1 (do inglês *programmed cell death-1*), que tem um papel



importante na estabilidade das interações das células T com as células B, e a molécula SAP (do inglês. *signaling lymphocytic activation molecule-associated protein*), que para além de igualmente ajudar a se formarem interações estáveis entre as células T e B, suporta a formação dos linfócitos Tfh e a formação dos centros germinais [59, 63].

Uma das citocinas mais produzida pelas células Tfh é a IL-21. Esta citocina, através do seu recetor IL-21R presentes nas células B, estimula estas últimas a diferenciarem-se em células B produtoras de anticorpos [64]. Para além da IL-10 e da IL-21, citocinas cuja produção é induzida pelo recetor ICOS após interação com o seu ligando, este recetor induz ainda a célula Tfh a produzir de IL-2 e IL-4 [59].

Apesar de estas moléculas serem das mais importantes expressas pelos linfócitos Tfh, estes expressam várias outras moléculas, como por exemplo a IL-6, IL-27, CD57, CD40L, CD154 [58, 65, 66].

#### 2.3.1.2.2. Diferenciação dos linfócitos Tfh

Ainda não se sabe muito bem como ocorre a diferenciação dos linfócitos Tfh. Para além disso ainda é desconhecido se estas células se diferenciam como um subtipo diferente de linfócitos ou se elas derivam das células Th1 ou Th2, apesar de existirem investigadores que tentam explicar cada uma destas hipóteses [67, 68].

É no entanto relativamente consensual que estes linfócitos expressam grandes quantidades de Bcl-6 (do inglês *B cell lymphoma 6*), uma proteína necessária para o seu desenvolvimento. Esta proteína é preferencialmente expressa pelos linfócitos Tfh mas não pelos linfócitos Th1 e Th2 [57, 69]. Para além disso a expressão de BLIMP-1 (do inglês *B lymphocyte-induced maturation protein 1*) é também importante na regulação da diferenciação dos linfócitos Tfh pois uma expressão elevada dessa proteína inibe o desenvolvimento dos mesmos. Temos assim que o balanço da expressão dos fatores de transcrição Bcl-6 e BLIMP-1 parece ser um elemento regulador essencial na indução da diferenciação dos linfócitos Tfh [57, 66].

A interleucina IL-21 tem também um papel fundamental na regulação da diferenciação das células Tfh, pois favorece o fator de transcrição característico destas células, o Bcl-6. Ela tem assim um papel autócrino nos linfócitos Tfh, já que, como vimos, é também produzida pelos mesmos [64, 69].

#### 2.3.1.2.3. Relação dos linfócitos Tfh com outros subtipos de linfócitos T

Embora os linfócitos Tfh possuam características que os distinguem de outros subtipos linfocitários, como são a elevada expressão de IL-21, do fator de transcrição Bcl-6 e das moléculas co-estimulatórias ICOS e PD-1, ainda não é bem perceptível se eles são uma subpopulação diferente de outros subtipos de linfócitos.

Alguns estudos verificaram que os linfócitos Tfh conseguem produzir quantidades significativas de IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-17, citocinas que estão normalmente associadas às células Th1, Th2 e Th17, respetivamente [60, 70]. Daqui se depreende que os linfócitos Tfh partilham características fenotípicas com outros subtipos de linfócitos, estando de algum modo associados com eles. Em contrapartida, outros estudos demonstram que poucas são as características dos subtipos Th1, Th2 e Th17 que estão presentes nos linfócitos Tfh, demonstrado que estas células são diferentes daquelas [71, 72]. Assim sendo são necessárias mais investigações para que melhor se possa entender a relação que este subtipo celular possui com outros subtipos de linfócitos.

#### 2.3.1.2.4. Linfócitos Tfh do sangue periférico

Como vimos os linfócitos Tfh estão presentes em grande número nas áreas foliculares e nos centros germinativos dos órgãos linfoides secundários, onde promovem a proliferação e a produção de anticorpos pelas células B. Contudo, uma pequena subpopulação de linfócitos T CD4 CXCR5<sup>+</sup> está também presente no sangue periférico, como células T de memória [60, 61]. No entanto a relação destes linfócitos “circulantes” com os linfócitos Tfh têm sido bastante controversa, não sendo ainda bem conhecida.

Inicialmente as células T CD4 CXCR5<sup>+</sup> presentes no sangue foram interpretadas como sendo células Tfh de memória [73]. Todavia o facto dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> do sangue, ao contrário do que acontece para os Tfh, não ajudarem *in vitro* os linfócitos B e do padrão de expressão génica ser diferente entre estes dois subtipos veio por em dúvida esta relação [71, 74]. Contudo, num estudo mais recente que os anteriores, Bossaller *et al.* veio sugerir que as células T CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> do sangue aparentam ser células Tfh de memória que passaram por uma reação nos centros germinais [75].

Devido a nem sempre ser viável aceder ao tecido linfoide secundário para se estudar o envolvimento das células Tfh com as imunodeficiências e com a autoimunidade, vários investigadores têm usado as células T CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> do sangue como uma

“medida” dos linfócitos Tfh, embora não se conheça bem a relação que existe entre estes dois tipos celulares [76]. Deste modo investigações realizadas recentemente têm-se preocupado em compreender se as células T CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> do sangue são ou não diferentes dos linfócitos Tfh. Morita *et al.* e Chevalier *et al.* demonstraram que os linfócitos circulantes T CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> secretam IL-21, expressam ICOS e Bcl-6 e induzem a produção de anticorpos pelas células B, sugerindo que eles realmente representam uma subpopulação circulante do tipo Tfh [77, 78]. Para além disso Morita e seus colaboradores sugeriram ainda que os linfócitos T CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> do sangue periférico podem ser distinguidos nos diferentes subtipos de linfócitos (Th1, Th2 e Th17), e que são mais eficientes em induzir as células B *naive* a se diferenciarem em plasmoblastos do que as células T CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> [78]. Contudo são escassos os estudos que caracterizam funcionalmente os linfócitos T CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> presentes no sangue, sendo assim necessária uma melhor caracterização destes linfócitos “circulantes”.

### 2.3.2. Diferenciação e função dos linfócitos T CD8

Após a ativação dos linfócitos T CD8 (ou Tc), que ocorre, como vimos, pela apresentação do antígeno pelas APC através das moléculas de MHC de classe I, estes diferenciam-se em linfócitos T citotóxicos efetores. Os linfócitos Tc efetores caracterizam-se por possuírem grânulos citoplasmáticos citotóxicos que estão associados à membrana, e que contêm perforinas e granzimas cuja função é destruir outras células [1, 2].

Existem também dois tipos de linfócitos T citotóxicos efetores: os linfócitos Tc1 e os linfócitos Tc2. As características fenotípicas e funcionais destes linfócitos assemelham-se muito aos Th1 e Th2 referidos anteriormente, com as Tc1 a produzirem principalmente IFN- $\gamma$  e as células Tc2 a produzirem essencialmente IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 [79].

#### 2.3.2.1. Linfócitos Tc17 – um terceiro e novo subtipo de células Tc

A elucidação do papel e do fenótipo das células Th17, bem como o conhecimento que leva à sua diferenciação, atraiu bastante atenção por parte dos investigadores. Em contraste, muito menos se sabe acerca das Tc17, células T CD8 que produzem IL-17 [80, 81]. Estas células, inicialmente identificadas nos ratos, foram também detetadas em humanos [52], mas o estudo do seu papel, fenótipo, e da sua diferenciação ao nível dos humanos é escasso.

Em comparação com as células Th17, a população de células Tc17 é muito menor. Contudo, parecem diferenciar-se na presença das mesmas citocinas que promovem a diferenciação das células Th17: IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-23 [81]. Expressam, tal como as Th17, o recetor CCR6 e o IL-23R [52, 81] e, ao contrário das Th17, parecem possuir uma expressão de CCR5 elevada e não expressam CCR4, o que faz supor que possuam uma diferente atividade quimiotática [80]. As células Tc17 expressam ainda, igualmente às células Th17, a molécula CD161, mas de uma forma mais intensa [82, 83]. Estes estudos fornecem ainda muito pouco conhecimento das células Tc17, sendo necessário uma maior investigação futura de tudo o que envolve este subtipo celular. Contudo a diferenciação, os fatores de transcrição, e o fenótipo das células Tc17 aparentam, na sua maioria, ser comuns aos das células Th17 [83].

### 2.3.3. Linfócitos T reguladores

Os linfócitos T reguladores (Treg) constituem uma pequena fração (5 a 10%) dos linfócitos CD4+, sendo identificados ainda por uma elevada expressão de CD25 e também pelo fator de transcrição *forkhead-box-P3*. Eles têm a capacidade de regular as respostas imunológicas através de um contacto direto com a célula alvo e pela produção de citocinas como TGF- $\beta$ , a IL-10 e a IL-23 ou pela libertação de perforinas e granzimas. O TGF- $\beta$  induz ainda a expressão do *forkhead-box-P3* de modo a manter a atividade supressiva destas células, e, na ausência de citocinas pro-inflamatórias, induz a diferenciação destes linfócitos [84, 85].

Cada um dos subtipos de linfócitos descritos, em conjunto com as restantes células do sistema imunitário, pratica então a defesa contra os microrganismos invasores. No entanto, quando o sistema imune não atua de forma correta na proteção do nosso organismo, diz-se que ocorre uma disfunção imune. São várias as manifestações da disfunção imune, sendo exemplos as imunodeficiências primárias, a alergia e as doenças autoimunes. O capítulo seguinte irá se focar nas doenças autoimunes, falando-se particularmente na Esclerose Sistémica e no papel que as células em estudo têm nesta doença.

### 3. DOENÇAS AUTOIMUNES

O sistema imune pode funcionar erradamente reagindo contra antígenos que são próprios do organismo, em vez de o fazer contra antígenos estranhos. Esta resposta inapropriada que se desenvolve é designada de autoimunidade e pode levar ao aparecimento de doenças autoimunes [3, 6].

As doenças autoimunes representam um grupo muito heterogéneo que pode envolver praticamente todos os órgãos, afetando 5 a 7% da população humana. Do ponto de vista clínico, estas doenças podem ser divididas em duas grandes categorias: doenças autoimunes específicas de órgão ou doenças autoimunes sistémicas. Nas doenças autoimunes específicas de órgão, a resposta imune é direcionada a um antígeno específico de um único órgão ou glândula, sendo que as manifestações são limitadas a esse órgão; exemplos são a Tiroidite de Hashimoto, a Diabetes Mellitus tipo 1 e a doença de Graves. Nas doenças autoimunes sistémicas a resposta imune é direcionada contra uma ampla gama de antígenos alvo, envolvendo um grande número de órgãos e tecidos, cujo dano é bastante generalizado; exemplos são o Lupus Eritematoso Sistémico, que acomete vários tecidos, a Esclerose Múltipla, onde há lesão do sistema nervoso central, e a Esclerose Sistémica [2, 6, 86], doença em estudo neste trabalho e que será desenvolvida mais à frente.

Na maioria das doenças autoimunes a etiopatogenia e os fatores de iniciação da doença continuam por ser esclarecidos. No entanto é geralmente aceite que a sua etiopatogenia é multifatorial e que resulta da interação de fatores genéticos e ambientais que funcionam como iniciadores da doença. Dentro dos fatores genéticos, os genes que parecem conferir um risco mais elevado são os do complexo major de histocompatibilidade, principalmente os de classe II, envolvidos, como vimos, na apresentação antigénica aos linfócitos T CD4. Os haplotipos de MHC podem influenciar a suscetibilidade à autoimunidade devido a, por exemplo, uma ineficácia na apresentação de antígenos do próprio organismo no timo, resultando daí a não eliminação dos linfócitos T auto-reactivos ou a diminuição dos linfócitos T reguladores. Apesar dos fatores genéticos influenciarem estas doenças, é necessário um iniciador ambiental ou interno para o estabelecimento das mesmas. Exemplos destes iniciadores são as infeções microbianas, infeções virais, fármacos e químicos [1, 6].

### 3.1. Papel dos linfócitos Th17 e Tc17 nas doenças autoimunes

Até há pouco tempo acreditava-se que os linfócitos Th1, devido à produção essencial de citocinas pró-inflamatórias, tinham um papel crucial no desenvolvimento de doenças autoimunes, como por exemplo a Artrite Reumatoide e a Esclerose Múltipla [87-89]. No entanto, este paradigma passou a ser contestado quando se observou que, em ratinhos, a ausência de sinalização pelo IFN- $\gamma$  (citocina maioritariamente produzida pelas células Th1) e pela IL-12 (citocina essencial na sua ativação) não constituía uma resistência ao desenvolvimento da autoimunidade; pelo contrário, estes animais estavam mais suscetíveis a estas doenças, desenvolvendo uma resposta imune significativa e, por vezes, mais agravada [90, 91]. Estas descobertas, juntamente com o reconhecimento de que a expressão de IL-17 pode ser detetada numa grande variedade de doenças autoimunes [42], levou a perceção de que outras células Th efetoras sejam capazes de induzir e perpetuar a inflamação local e a autoimunidade [87, 88].

O conhecimento do novo subtipo de células Th17, e o facto de a IL-17 ser uma citocina pró-inflamatória principalmente produzida por estas células, levou a crer que a patogénese das doenças descritas, entre outras, esteja intimamente ligada com a presença das células Th17. De facto, a associação das células Th17 com inflamações patológicas está mais estabelecida do que o conhecimento que se possui acerca do seu papel nos mecanismos normais de defesa imune [45]. Aliás, os maiores avanços na compreensão das funções imunes destas células ocorreram a partir de estudos realizados em modelos de ratinhos de autoimunidade [88]. Exemplos são: a Encefalomielite Autoimune Experimental, um modelo de ratinho de esclerose múltipla; a Artrite Induzida por Colagénio, um modelo de ratinho de Artrite reumatoide; e ainda modelos de ratinhos de colite (inflamação do intestino). Na Encefalomielite Autoimune Experimental verificou-se que a deficiência de IL-17 ou o uso de anticorpos que bloqueiam esta citocina diminuiu a sua severidade [92]. No modelo Artrite Induzida por Colagénio, ratos tratados com antagonistas do recetor de IL-17 reduziram significativamente as manifestações da doença [93] e ainda o tratamento com anticorpos monoclonais anti-IL-17 levou a uma melhoria na destruição articular [94]. Nos modelos de ratinhos de colite verificou-se uma redução significativa na migração dos neutrófilos para o intestino e nas quimiocinas aquando o bloqueio do recetor da citocina IL-17 [95].

Nos humanos existem também alguns estudos que sugerem um papel importante da citocina característica das células Th17 na patogénese de doenças autoimunes, apesar de serem menos elucidativos. Uma das doenças onde se verifica este comprometimento é na Artrite Reumatoide. Foi verificado que nesta doença os níveis de IL-17 estão elevados no líquido sinovial (líquido das cavidades articulares) e no soro dos doentes com Artrite Reumatoide [96-98]. Para além disto outros estudos demonstraram que a citocina IL-17 promove a destruição da cartilagem, inibe a síntese de colagénio e induz a reabsorção óssea em pacientes com a doença [99, 100]. Estes resultados, em conjunto com os resultados de *Lepie, et al*, que demonstraram que as células Th17 e a citocina IL-17 estão aumentadas no sangue periférico de indivíduos com Artrite Reumatóide, indicam que as células Th17 estão implicadas no desenvolvimento e progressão desta doença [101].

Para além da Artrite Reumatóide, também na Esclerose Múltipla foi proposto um papel patogénico das células Th17. Em 1999, Matusevicius *et al.* verificaram que o mRNA da citocina IL-17 estava aumentado no sangue e no fluido cérebroespinal de pacientes com Esclerose Múltipla [102]. Em outro estudo de 2002, *Lock et al.* mostraram que a citocina IL-17 estava muito expressa em lesões do sistema nervoso central de pacientes com esta patologia [103]. Além disso, estudos de células humanas realizados *in vitro* demonstraram que os linfócitos Th17 conseguem atravessar a barreira hemato-encefálica e destruir os neurónios pela libertação de granzima B, promovendo a inflamação do sistema nervoso central e a infiltração de outras células inflamatórias [104]. Mais recentemente *Tzartos* e os seus colaboradores descobriram a presença de linfócitos IL-17 positivos em lesões cerebrais de pacientes com Esclerose Múltipla [105].

A relação das células Th17 com Lupus Eritematoso Sistémico é muito menos clara e ainda pouco se sabe; de facto o seu envolvimento na patogénese desta doença ainda possui poucos estudos [87, 106]. Em estudos recentes, foram detetados níveis elevados de IL-17 no soro de pacientes com Lupus Eritematoso Sistémico [107, 108] e ainda uma proporção aumentada de células Th17 no sangue periférico de pacientes com esta doença [109]. O papel patogénico das células Th17 também tem sido proposto em outras doenças autoimunes, como são por exemplo a Psoríase e as doenças inflamatórias intestinais, principalmente a doença de Crohn e a Colite ulcerativa [88, 110].

Relativamente às células Tc17, tal como acontece com o conhecimento da sua diferenciação e características fenotípicas, ainda são escassos os estudos que envolvem esta

célula com as doenças autoimunes. *Ortega* et al. demonstraram uma quantidade elevada de células Tc17 em lesões da pele de doentes com Psoríase [81]. Estas células também se encontram elevadas no sangue periférico de doentes com Artrite Reumatóide [111] e de doentes com Lupus Eritematoso Sistémico [109].

Todos estes estudos levam a crer que a regulação inapropriada das células Th17 e das células Tc17 poderá ter um papel fundamental no desenvolvimento das várias doenças autoimunes.

### 3.2. Papel dos linfócitos Tfh na doenças autoimunes

Embora o conhecimento que envolve os linfócitos Tfh seja relativamente pequeno, existem investigações que provam que estas células estão envolvidas em algumas doenças autoimunes. Estudos em ratinhos demonstraram que a citocina IL-21 parece ser crítica para o desenvolvimento de Lupus, pois a sua sobreprodução acompanhada com o aumento do desenvolvimento das células Tfh levou ao desenvolvimento de uma doença tipo Lupus [112].

Em humanos também se sugere que a expansão das células Tfh está envolvida no desenvolvimento de Lupus Eritematoso Sistémico, pois demonstrou-se um aumento da frequência de células T CD4 a expressar ICOS (molécula bastante expressa pelas células Tfh) no sangue periférico de doentes com esta doença [113]. Mais recentemente Simpson e os seus colaboradores demonstraram que estas células estavam aumentadas no sangue periférico de um subtipo de doentes com Lupus [114], reforçando a ideia do envolvimento das células Tfh nesta doença.

Existem ainda evidências de que as células Tfh têm um papel importante no desenvolvimento de Síndrome de *Sjogren* [115] e que as células Th17 CXCR5+ estão aumentadas em Dermatomiosite Juvenil [78]. Embora ainda não se compreenda bem o papel destas células na autoimunidade, todos estes estudos fortalecem a ideia de que as células Tfh estão de algum modo envolvidas em doenças caracterizadas por uma desregulação autoimune.

### 3.3. Esclerose Sistémica

A Esclerose Sistémica (SSc, do inglês *Systemic Sclerosis*), também conhecida como esclerodermia ou esclerose sistémica progressiva, é uma doença reumática autoimune



sistêmica do tecido conjuntivo, caracterizada por alterações do sistema vascular e imune, que levam à fibrose da pele e órgãos internos [116, 117]. A SSc, provavelmente a doença do tecido conjuntivo mais grave, é uma doença rara com importantes manifestações clínicas que levam a uma elevada morbidade e mortalidade entre as doenças reumáticas [116, 118], sendo o envolvimento dos pulmões a causa mais comum de morte nesta doença [119].

Devido à sua relativa raridade e às características diversas da esclerose sistêmica, os estudos acerca da sua epidemiologia têm sido difíceis de realizar. Para além disso, a incidência e a prevalência da SSc varia muito dependendo da localização geográfica e da etnia [120]. Esta doença afeta principalmente mulheres, com um rácio mulheres/homens variando de 1:1 para 14:1, na faixa etária dos 40 aos 60 anos de idade [120, 121]. A prevalência parece ser consistentemente maior nos EUA em comparação com a Europa ou Japão. Embora existam variações geográficas entre os diversos continentes, na Europa tem-se verificado uma menor prevalência da SSc nos países do norte [122, 123].

### 3.3.1 Alterações patológicas características

A pele é o órgão mais afetado nos doentes com Esclerose Sistêmica. As alterações patológicas que nela ocorrem nos pacientes afetados dependem, em parte, da precocidade das lesões e do subtipo de doença que o paciente possui [116, 124]. Contudo, as três principais alterações são o aumento da quantidade de colagénio, vasos sanguíneos lesados e infiltrados inflamatórios que se localizam em redor dos pequenos vasos sanguíneos da derme, na derme inferior e subcutaneamente [6, 116].

Os órgãos internos, como os pulmões, o trato gastrointestinal, os rins e o coração, são também geralmente afetados por esta doença, principalmente pela fibrose que se desenvolve. Os pulmões podem ser afetados por uma pneumonia intersticial não específica levando a uma fibrose pulmonar e, mais tardiamente, ao espessamento da membrana alveolar. No trato gastrointestinal, a atrofia das fibras musculares lisas é a lesão mais característica, levando à dismotilidade do tubo digestivo. O rim é principalmente afetado por hiperplasia das artérias interlobulares (ramificações das artérias que o constituem). No coração ocorre a degeneração das fibras do miocárdio e uma fibrose intersticial em redor dos vasos sanguíneos [6, 116, 124].

### 3.3.2. Classificação dos diferentes tipos de esclerose sistêmica

Os pacientes com Esclerose Sistêmica são geralmente classificados em dois subtipos clínicos principais, especialmente de acordo com a extensão e o padrão de envolvimento da pele: SSc limitada e SSc difusa. A intensidade e a extensão do espessamento cutâneo são avaliadas através da palpação da pele utilizando o *score* de Rodnan modificado, que avalia o espessamento cutâneo em 17 sítios anatômicos usando uma escala de 0 (pele normal) a 3 (espessamento cutâneo grave) [125].

A SSc limitada caracteriza-se por um espessamento da pele que se encontra limitado à face, pescoço e a áreas desde as extremidades distais até aos cotovelos e joelhos, e muitas vezes apenas até aos pulsos e tornozelos, com pouco envolvimento dos órgãos. Já a SSc difusa caracteriza-se por um espessamento da pele das áreas próximas dos joelhos e cotovelos, do tórax e do abdômen, e por fibrose dos órgãos internos, o que pode levar à falha dos mesmos [6, 124, 126].

Estes dois subtipos de SSc são os mais bem caracterizados até hoje, mas existem mais subtipos desta doença. Um exemplo é a SSc sem escleroderma que inclui pacientes sem espessamento cutâneo aparente, mas com alterações vasculares em órgãos internos, características da SSc. Pacientes com esclerose sistêmica podem também demonstrar sinais de outras doenças do tecido conjuntivo, como por exemplo o lúpus eritematoso sistêmico ou a dermatomiosite, sendo isto designado de síndrome de sobreposição [124, 126].

### 3.3.3 Etiologia da doença

A etiologia da Esclerose Sistêmica permanece ainda obscura, pois as causas que levam a esta doença não são bem conhecidas e algumas até ainda se mantêm controversas [127]. Contudo a sua origem é provavelmente multifatorial, com a predisposição genética, os fatores ambientais e as funções imunes anormais a desempenharem um papel essencial [118, 128].

Um estudo recente realizado em 2010 investigou a hereditariedade de três manifestações da SSc (vasculopatia, desregulação imune e fibrose) em mais de 7 milhões de indivíduos do Utah. Este estudo relatou 1037 casos de Esclerose Sistêmica e os autores concluíram que a presença de SSc numa família confere um risco significativo de SSc em parentes de primeiro grau [129]. No entanto, um estudo realizado em gémeos com SSc demonstrou uma menor concordância na expressão clínica da doença [130]. Estes achados,

em junção com o facto da probabilidade de se desenvolver SSc ser de menos de 1% entre os descendentes dos pacientes afetados [128], levam a concluir que a suscetibilidade genética por si só não é suficiente para explicar o desenvolvimento desta doença, apesar de poder proporcionar um ambiente permissivo que permite tanto o início da SSc como a sua progressão e desenvolvimento [116, 118].

Exemplos de fatores ambientais que aparentam aumentar o risco da esclerose sistémica são a exposição a sílica cristalina, ao pó de sílica [131] e a solventes orgânicos [132]. Para além disso alguns vírus, como o citomegalovirus humano e o parvovirus B19 (atualmente também conhecido como eritrovirus B19), e bactérias, como a *Helicobacter pylori*, têm sido propostos como fatores desencadeantes da Esclerose Sistémica [116, 133]. Ohtsuka e Yamazaky demonstraram uma elevada e significativa prevalência do parvovirus B19 na pele de pacientes com SSc (75%) em comparação com controlos normais (52%) [134]. Ferri *et al.* demonstraram a presença de infeção pelo parvovirus B19 na medula óssea em pacientes com SSc [135] e, em outro estudo, sugeriram que a presença de citomegalovirus poderia também ser uma causa de SSc, já que esta doença surgiu numa paciente logo após uma curta infeção por este vírus [136]. Num estudo realizado por Kalabay *et al.* verificou-se que também a bactéria *Helicobacter pylori* foi encontrada em pacientes com esclerose sistémica [137]. Apesar de estes estudos fornecerem importantes informações ligando os agentes infecciosos à doença em questão, ainda é necessário encontrar-se uma direta associação entre os mesmos.

### 3.3.3.1 Hipóteses sobre a sua patologia

Embora a etiologia da Esclerose Sistémica ainda não seja conhecida, existem atualmente algumas hipóteses que tentam explicar o processo pelo qual esta doença se desenvolve.

A maior parte das doenças autoimunes possui uma predominância do sexo feminino, e a Esclerose Sistémica não é exceção. Vários estudos têm demonstrado uma associação entre o desenvolvimento da esclerose sistémica em mulheres após a gravidez, e a deteção de células fetais no sangue periférico das mesmas [138, 139]. Este evento, conhecido como microquimerismo, ocorre quando as células do feto entram na circulação materna e persistem, na progenitora, durante várias décadas após o parto [73]. Esta hipótese também prevê que as células maternas passem para o feto, causando doenças no

feto. Estes pressupostos explicariam a prevalência superior em mulheres já com filhos, mas também explicariam a existência da doença em homens. A consequência desta transferência imunológica ainda não é bem entendida, mas é possível que possa ter um papel nas doenças autoimunes [140]. Tem sido sugerido que estas células são ativadas por um estímulo ambiental, desenvolvendo reações que podem levar a sintomas clínicos característicos da esclerose sistêmica [118, 141].

O “mimetismo molecular” é um mecanismo que pode explicar a patogenicidade dos anticorpos contra proteínas virais na SSc. O mimetismo ocorre quando um organismo invasor penetra num hospedeiro levando a uma resposta imune onde existe produção de anticorpos que, para além de atacarem o organismo invasor, reagem contra os próprios antígenos do hospedeiro. Isto pode ocorrer por existirem semelhanças entre os antígenos do invasor e os próprios antígenos [118]. A infeção pelo citomegalovírus humano, por exemplo, pode gerar uma resposta anti-viral que é também auto-reativa contra os antígenos das células endoteliais [127].

O dano das células endoteliais é também considerado uma hipótese que leva ao desenrolar da SSc. Estas células que recobrem o interior dos vasos sanguíneos podem ser infetadas por vírus ou bactérias, o que se torna um ponto de partida para o desenvolvimento de vasculites, por outras palavras, inflamações nos vasos sanguíneos. Como consequência existe o recrutamento de leucócitos levando a uma resposta inflamatória exacerbada característica da SSc [142].

### **3.3.4. Patogenia da Esclerose Sistêmica**

A Esclerose Sistêmica possui três características principais responsáveis pelas manifestações patológicas que nela ocorrem: (1) alterações vasculares e (2) desregulação do sistema imune, que levam à inflamação crónica e à ativação dos fibroblastos, resultando numa (3) fibrose tecidual generalizada com uma deposição excessiva de colagénio e outras componentes da matriz extracelular.

#### **3.3.4.1. Disfunção vascular**

A primeira manifestação clínica que ocorre nos pacientes com SSc é, geralmente, o fenómeno de Raynaud. Este fenómeno, que ocorre em mais de 95% dos pacientes com SSc [143], caracteriza-se por uma vasoconstrição excessiva dos vasos sanguíneos, geralmente

em resposta à exposição ao frio, manifestando-se como episódios de alteração da coloração das extremidades (mãos e/ou pés) que ocorre em três fases sucessivas (palidez, cianose e vermelhidão), podendo ser acompanhado por sensação de adormecimento e dor no local [144]. Este fenómeno é uma expressão clínica da disfunção vascular, o que sugere que esta disfunção seja um dos eventos iniciais da SSc [6, 127].

A progressão da lesão vascular na SSc inclui uma ativação e um dano endotelial persistente e um espessamento da camada vascular interna [116]. A disfunção e ativação das células endoteliais, o que pode ser causado por citocinas pro-inflamatórias, provocam alterações na permeabilidade vascular, pelo aumento da expressão de VCAM-1 (*Vascular cell adhesion protein 1*) e de ELAM-1 (*endothelial-leukocyte adhesion molecule 1*) nas células endoteliais [145], o que leva a uma infiltração de células inflamatórias e a um consequente dano endotelial [120]. O dano das células endoteliais é refletido pelos elevados níveis do fator VIII/fator von Willebrand no soro de pacientes com SSc [146, 147]. O espessamento da camada vascular interna leva a um estreitamento do vaso sanguíneo e, consequentemente, a uma isquemia tecidual, fibrose e, por fim, disfunção dos órgãos [116].

Para além destas características os doentes com SSc possuem uma remodelação vascular desregulada e uma angiogénese e vasculogénese comprometida [116, 127], situações que são necessárias aquando o dano e oclusão dos capilares. Assim sendo, estes doentes têm pouca capacidade de reconstruir a perfusão dos vasos e de então garantir um adequado fornecimento de oxigénio aos tecidos.

#### 3.3.4.2. Desregulação imune

Outra característica de destaque da Esclerose Sistémica é a implicação do sistema imune, pois, como vimos, esta é uma doença autoimune. De facto os doentes com esta patologia caracterizam-se por possuírem auto-anticorpos antinucleares, ocorrendo em 75%-95% dos pacientes [73], nomeadamente o anti-centromero, o anti-topoisomerase 1 e o anti-RNA-polimerase III. Estes auto-anticorpos são mutuamente exclusivos e identificam os distintos subtipos clínicos desta doença [116, 141].

O infiltrado celular da pele que ocorre nos doentes com SSc consiste principalmente em células T CD3, onde as células T CD4 predominam em relação às T CD8 [148, 149]. Outras células presentes neste infiltrado são as células  $T\gamma\delta$ , os

macrófagos, as células B e as células NK [120]. Vários estudos sugerem que as células T, tanto as que se infiltraram para a pele como as que se encontram no sangue periférico dos doentes com SSc, possuem um perfil predominantemente característico das Th2 produzindo as citocinas IL-4 e IL-13 [150-152]. Ambas estas citocinas estimulam a produção de TGF- $\beta$ , uma citocina pró-fibrótica produzida pelos fibroblastos e pelas células endoteliais que tem um papel crucial no desenrolar da fibrose, pois estimula a proliferação dos fibroblastos e a síntese de matriz extracelular, principalmente colagénio [6, 116, 118]. A síntese de colagénio por esta citocina parece ser favorecida pela presença de TNF- $\alpha$  e existem estudos que revelam níveis significativamente elevados desta citocina no soro de doentes com Esclerose Sistémica [153, 154]. Pelo contrário, o IFN- $\gamma$  (citocina característica das células Th1) parece inibir a síntese de colagénio, anular os efeitos do TGF- $\beta$  e inibir diretamente a proliferação dos fibroblastos [155, 156]. Alguns pacientes com SSc demonstram uma diminuição dos níveis séricos desta citocina e parece que os fibroblastos destes doentes são mais resistentes à mesma [141, 156]. Contudo, tanto o papel do IFN $\gamma$  como do TNF- $\alpha$  na SSc é ainda muito pouco compreendido. O soro dos pacientes com esta doença caracteriza-se ainda por possuir a citocina IL-2 numa quantidade três vezes maior à normal. Para além disso a expressão do recetor de IL-2 na membrana dos linfócitos T é também maior, comparada com controlos normais [6, 118].

#### 3.3.4.3. Fibrose – o passo final da fisiopatologia da SSc

A fibrose, que se caracteriza pela deposição excessiva de componentes da matriz extracelular como o colagénio, é o passo final que ocorre na patogénese da Esclerose Sistémica, sendo a característica proeminente desta patologia. Pensa-se que a fibrose resulte da interação dos processos vasculares e imunes que a precedem. Ela não ocorre apenas na pele, mas também em muito outros órgãos como são os pulmões, o trato gastrointestinal, coração, tendões e ligamentos, o que pode levar a uma disfunção significativa destes órgãos [116, 127].

Os fibroblastos são as células responsáveis pela remodelação da matriz extracelular. Nos doentes com SSc os fibroblastos têm um papel crucial no desenvolvimento da fibrose pois eles estão exageradamente ativados, produzindo as proteínas da matriz extracelular em demasia, principalmente o colagénio, após a ocorrência de feridas [141, 157]. Os miofibroblastos, células que se diferenciam a partir dos fibroblastos na presença de

trombina, também têm um papel importante no desenrolar da fibrose na SSc pois também eles sintetizam grandes quantidades de colagénio e outras proteínas da matriz extracelular [127, 141]. Como vimos anteriormente, o TGF- $\beta$  estimula a proliferação dos fibroblastos e a síntese de colagénio. Vários estudos identificaram anormalidades na via de sinalização desta citocina, que envolve proteínas designadas de Smad, na Esclerose Sistémica [158, 159]. Assim sendo o TGF- $\beta$  parece ter um papel principal na iniciação e desenvolvimento da fibrose em doentes com SSc. Contudo outros fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, como são a endotelina-1, o fator de crescimento derivado de plaquetas e o fator de crescimento do tecido conjuntivo, podem ainda contribuir para esse processo [116].

Embora as proteínas e células descritas estejam de algum modo associadas com a fibrose, os mecanismos fundamentais que regulam a fibrose excessiva nas Esclerose Sistémica são ainda desconhecidos, provavelmente pelo complexo processo fibrótico e pelos seus múltiplos níveis de regulação. Apesar de não se saber em detalhe as causas e o processo patológico desta doença, existe um papel muito importante do sistema imune que é necessário explorar.

### 3.3.5. Tratamento da patologia

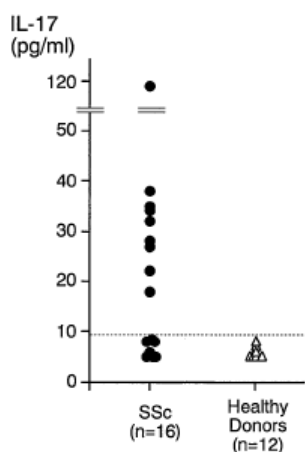
A Esclerose Sistémica ainda não tem cura, sendo que o tratamento que se pode oferecer aos doentes é sobretudo dirigido aos sintomas. A terapia farmacológica parece ser a mais usada para esse fim, embora nem sempre impeça a progressão da doença. Contudo é difícil de avaliar pois o percurso e a diversidade da doença são bastante variáveis, especialmente dentro dos seus subtipos [6]. Assim sendo, a terapia farmacológica usada na SSc depende do subtipo da doença e das complicações dos órgãos envolvidos [124].

A terapia farmacológica pode ser dividida em estratégias imunossupressoras, vasculares e anti-fibróticas. As terapias imunossupressoras são usadas essencialmente na SSc difusa e na fibrose pulmonar, e são exemplos o uso de ciclofosfamida e do micofenolato (que é menos tóxico). As terapias vasculares podem ser usadas em todos os tipos de SSc sendo um exemplo o uso de bloqueadores de angiotensina II. O tratamento das lesões fibróticas é mais difícil e existem menos estudos neste âmbito [124].

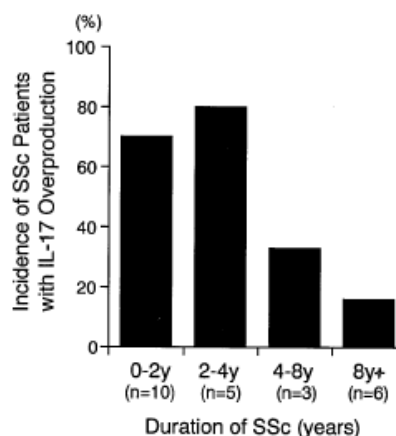
### 3.4. Células Th17, Tc17 e Tfh na Esclerose Sistémica

A disfunção imune é uma das principais causas da Esclerose Sistémica, já que esta é classificada como uma doença autoimune. As alterações da disfunção imune são essencialmente caracterizadas por uma aberrante modificação da biologia das células T. Na SSc as células T CD4+ estão de facto aumentadas [148, 149], mas o que leva realmente a que ocorra esta disfunção é, tal como em outras doenças autoimunes, ainda desconhecida. O conhecimento de um novo subtipo de células produtoras de IL-17 (Th17 e Tc17) abriu novas hipóteses e possibilidades de explicação para a patogénese da SSc, bem como para outras patologias caracterizadas por autoimunidade [160, 161].

Uma das poucas e primeiras investigações realizadas envolvendo a citocina IL-17 na patogénese da Esclerose Sistémica ocorreu no ano de 2000. Neste estudo, Kurasawa *et al.* demonstraram que os níveis de citocina IL-17 estavam elevados no sangue periférico, no soro (ver figura 4) e ainda em lesões fibróticas da pele e dos pulmões de indivíduos com SSc. Para além disso, evidenciaram que a sobreprodução de IL-17 estava mais significativamente relacionada com as fases iniciais da doença (ver figura 5). Este estudo revelou ainda que a citocina em questão, *in vitro*, favorece a proliferação de fibroblastos. Por estes resultados, estes investigadores concluíram que a IL-17 tem um papel importante na patogénese da SSc, especialmente nas fases iniciais da doença, pela ativação de fibroblastos e de células endoteliais [162].



**Figura 4.** Níveis séricos de IL-17 em pacientes com SSc, comparados com pessoas normais (adaptado de [137])



**Figura 5.** Variação da produção de IL-17 ao longo do tempo de duração de SSc [137]



Os estudos relacionando a citocina IL-17 com o desenrolar da SSc só mais tarde tornaram a surgir, quando se descobriu que um novo subtipo de células que se caracterizavam pela produção dessa citocina, as células Th17/Tc17, estavam muito fortemente envolvidas no desencadear de várias doenças autoimunes (como vimos anteriormente), devido essencialmente à produção de citocinas pró-inflamatórias. Em 2008, Murata *et al.* confirmaram os resultados do anterior estudo, quando verificaram que os níveis séricos de IL-17 estavam significativamente elevados em doentes com SSc, quando comparados com controlos saudáveis; no entanto não verificaram nenhuma diferença entre a SSc difusa e a SSc limitada [163]. Contudo, em contraste com estes resultados, um outro estudo demonstrou que a citocina IL-17 não foi detetada no plasma de pacientes com SSc, apesar de terem detetado elevados níveis de IL-6, IL-1 $\alpha$  e IL-23, citocinas que favorecem a diferenciação das células Th17/Tc17 [160].

Estudos posteriores e muito recentes focaram-se essencialmente na presença das células Th17 no sangue periférico de indivíduos com Esclerose Sistémica [161, 164, 165]. Fenoglio *et al.* foram os primeiros a demonstrar, através de uma análise por citometria, que as células Th17 estão aumentadas no sangue periférico de pacientes com SSc, quando comparado com pacientes normais. Conjugando os seus resultados com outros obtidos, estes investigadores propuseram que esta doença pode estar bastante relacionada com uma polarização da resposta imune na direção das células Th17 [164]. Também o trabalho de Rodríguez-Reyna *et al.* e de Truchetet *et al.* veio demonstrar, por citometria de fluxo, que as células Th17 se encontram aumentadas no sangue periférico de indivíduos afetados por SSc, quando comparado com pessoas sem a doença [161, 165]. Truchetet e o seu grupo verificou ainda que estas células realmente se caracterizam por possuírem o recetor CD161, para além do CCR6, levando a que possuam um grande potencial para se deslocarem para a pele e para os pulmões.

Apesar destes poucos estudos terem evidenciado a presença da citocina IL-17 e das células Th17 no sangue periférico, soro e plasma de pacientes com Esclerose Sistémica, a contribuição que esta célula poderá ter na patogénese desta doença ainda é muito especulativa. De facto, ainda que se relacione este subtipo celular com lesões teciduais autoimunes, muito pouco se sabe acerca do seu papel, quer na SSc, quer em outras doenças autoimunes, como as que vimos anteriormente. Torna-se assim importante e necessária uma compreensão das vias reguladoras de IL-17, e da função das células Th17, para que

melhor se possa entender a fisiopatologia das doenças autoimunes, e assim contribuir para o desenvolvimento de novas opções e intervenções terapêuticas [88].

Embora se relacionem as células Tc17 e células Tfh com outras doenças autoimunes, o seu envolvimento em Esclerose Sistémica não foi, até hoje, estudado a nenhum nível.

#### **4. OBJETIVOS**

Embora alguns estudos, principalmente nos últimos anos, tenham sido realizados envolvendo a citocina IL-17 e as células Th17 em Esclerose Sistémica, o papel dessas células nessa doença ainda não é bem compreendido. Para além disso, apesar de relacionarem as células Tc17 e, em menor muito menor número, as células Tfh com as doenças autoimunes, a sua função em Esclerose Sistémica não foi ainda investigada.

Deste modo o objetivo principal deste trabalho foi quantificar e caraterizar funcionalmente as células Th17, Th1, Tc17 e Tc1 e as células Th17 CXCR5<sup>+</sup> e Th1 CXCR5<sup>+</sup> no sangue periférico de pacientes com Esclerose Sistémica, comparando com controlos saudáveis. Para alcançar este objetivo procedeu-se à:

- i) determinação da frequência das células Th17 e Tc17 no sangue periférico;
- ii) determinação da frequência das células Th17, Th1, Tc17 e Tc1 a produzir as citocinas IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ;
- iii) determinação da frequência de células Th17 CXCR5<sup>+</sup> e Th1 CXCR5<sup>+</sup> no sangue periférico;
- iv) determinação da frequência das células Th17 CXCR5<sup>+</sup>, Th17 CXCR5<sup>-</sup>, Th1 CXCR5<sup>+</sup> e Th1 CXCR5<sup>-</sup> a produzir as citocinas IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ;
- v) determinação da quantidade de cada uma dessas citocinas produzida por célula

A compreensão do papel destas células em Esclerose Sistémica poderá possibilitar o desenvolvimento de novas terapêuticas, de modo a reduzir a elevada morbilidade e mortalidade associada a esta doença.

## **II. Material e métodos**



## 1. População em estudo

Neste trabalho, realizado entre Setembro de 2011 e Junho de 2012, estudaram-se amostras de sangue periférico de um grupo de indivíduos afetados por Esclerose Sistémica e de um grupo controlo. As amostras do sangue periférico dos doentes com Esclerose Sistémica e dos indivíduos do grupo controlo foram colhidas em tubos de heparina no Serviço de Reumatologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra e no Centro de Histocompatibilidade do Centro, respetivamente. Todos os pacientes com SSc preenchem os critérios preliminares definidos pelo Colégio Americano de Reumatologia [166]. Todos os participantes foram devidamente informados acerca do estudo, tendo assinado um consentimento informado.

Do grupo controlo fizeram parte 16 mulheres e 4 homens adultos saudáveis com uma média de idades de  $51,1 \pm 10,1$  e  $55,8 \pm 9,1$  anos, respetivamente. Os doentes afetados por SSc foram subdivididos consoante o subtipo clínico da doença, de acordo com *LeRoy* [167]: afetados por SSc limitada estavam 24 mulheres e 6 homens com uma média de idades de  $58,5 \pm 13,7$  e  $51,8 \pm 11,9$  anos, respetivamente; afetados por SSc difusa estavam 10 mulheres e 3 homens com uma média de idades de  $54,5 \pm 9,2$  e  $60,3 \pm 11,0$  anos. As características clínicas dos doentes com SSc estão apresentadas na tabela 1.

**Tabela 1.** Características clínicas dos doentes com SSc.

Características	SSc limitada (n=30)	SSc difusa (n=13)
Duração da doença após diagnóstico (anos)	$9,77 \pm 8,10$	$8,46 \pm 8,99$
Presença de anticorpos antinucleares isolados	30,0 % (n=9)	0,00 %
Presença do Anticorpo Scl-70	0,00 %	100 %
Presença do Anticorpo anti-centrómero	70,0 % (n=21)	0,00 %
Espessamento da pele (Score de Rodnan modificado)	$10,4 \pm 6,45$	$18,8 \pm 10,1$
Úlceras ou história	33,3 % (n=10)	53,8 % (n=7)
Hipertensão pulmonar	6,67 % (n=2)	15,4 % (n=2)
Fibrose pulmonar	26,7 % (n=8)	61,5 % (n=8)
Capacidade de difusão pulmonar de CO	$95,6 \pm 19,5$	$79,5 \pm 19,9$
Tratamento		
Vasodilatadores	100 %	100 %
Imunosuppressores	16,67 % (n=5)	0 %
Corticoides	43,3 (n=13)	46,15 % (n=6)
IECA	26,67 % (n=8)	30,77 % (n=4)

IECA, inibidor da enzima de conversão da angiotensina

Os doentes com SSc foram também divididos consoante o tempo de duração da doença após diagnóstico, de acordo com Corriveau [168]: 6 doentes possuíam menos de um ano de duração da doença (Grupo 1); 21 doentes possuíam entre 1 e 10 anos de duração da doença (Grupo 2); 16 doentes possuíam mais de 10 anos de duração da doença (Grupo 3).

## 2. Quantificação e caracterização funcional das células Th(c)17 e Th(c)1 no sangue periférico

### 2.1. Estimulação *in vitro* de linfócitos T

Para se quantificar a produção de citocinas pelos linfócitos em estudo, as células foram inicialmente estimuladas *in vitro*. 500 µL do sangue periférico colhido foi adicionado a 500 µl de RPMI-1640 (Gibco; Painactive SLEy, Escócia, Reino Unido) suplementado com 2 mM L-glutamina. A este meio adicionou-se ainda 10 µg/ml Brefeldina A (Sigma, Saint Louis, MO, EUA), 50 ng/ml de acetato de forbol miristato (PMA, *phrobol 12-myristate 13-acetate*) (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) e 1 µg/ml de Ionomicina (Sigma, Saint Louis, MO, EUA). O tubo, após devidamente tapado com *parafilm*, foi colocado a incubar em ambiente húmido e estéril durante 4 horas, a 37°C e com uma concentração de 5% de CO<sub>2</sub>.

### 2.2. Marcação intracitoplasmática das citocinas em estudo

Após as 4 horas de incubação, procedeu-se à marcação intracitoplasmática das citocinas em estudo. Para 3 diferentes tubos pipetaram-se 250 µl do sangue periférico estimulado anteriormente, adicionando-se, em seguida, a todos os tubos os anticorpos monoclonais conjugados com os diferentes fluorocromos listados na tabela 2. Os volumes utilizados foram os recomendados pelos respetivos fabricantes.

**Tabela 2.** Especificidade, clone e origem dos anticorpos monoclonais utilizados no início da marcação intracitoplasmática das citocinas em estudo.

Anticorpo Monoclonal	Clone	Fluorocromo	Marca	Localização
Anti-CD3	UCHT1	Azul do pacífico	BD <i>Pharmingen</i>	EUA
Anti-CD8	RPA-T8	Laranja do pacífico	BD <i>Horizon</i>	EUA
Anti-CXCR5	51505	Aloficocianina	R&D <i>Systems</i>	Europa

Após homogeneização em vortex, os tubos foram colocados em incubação durante 10 minutos à temperatura ambiente e protegidos da luz, por forma a garantir as condições ótimas de ligação dos anticorpos à superfície das células e evitando a perda de fluorescência pelos fluorocromos conjugados a estes.

Decorrido este período, adicionou-se, a cada tubo, 200 µl da solução 1 do Kit de fixação e permeabilização Intraprep (Beckman Coulter Inc., Brea, Califórnia), de forma a fixar os leucócitos. Após homogeneização em vortex, tornaram-se a colocar os tubos a incubar durante 10 minutos sob as mesmas condições anteriores.

Procedeu-se depois à lavagem da amostra pela adição de 2 mL de tampão fosfato-salino (PBS, *phosphate buffered saline*) (Dulbecco 1x, Biochrom Ag, Berlim, Alemanha), diluído a 1/10 em água destilada, a cada um dos tubos, seguido de uma centrifugação (430 g, 5 minutos) na centrífuga da Kubota-Corporation (modelo 5910, Tóquio, Japão). Rejeitou-se o sobrenadante, por forma a eliminar o excesso de anticorpos monoclonais. Adicionou-se posteriormente a cada tubo 200 µl da solução 2 do Kit Intraprep, de modo a se permeabilizarem as membranas dos leucócitos e a efectuar a lise dos eritrócitos, e homogeneizou-se em vortex. Procedeu-se, em seguida, à adição dos anticorpos monoclonais conjugados com os diferentes fluorocromos listados na tabela 3. Os volumes utilizados foram os recomendados pelos respetivos fabricantes. O conteúdo foi homogeneizado em vortex, seguindo-se uma incubação durante 10 minutos, nas mesmas condições anteriores.

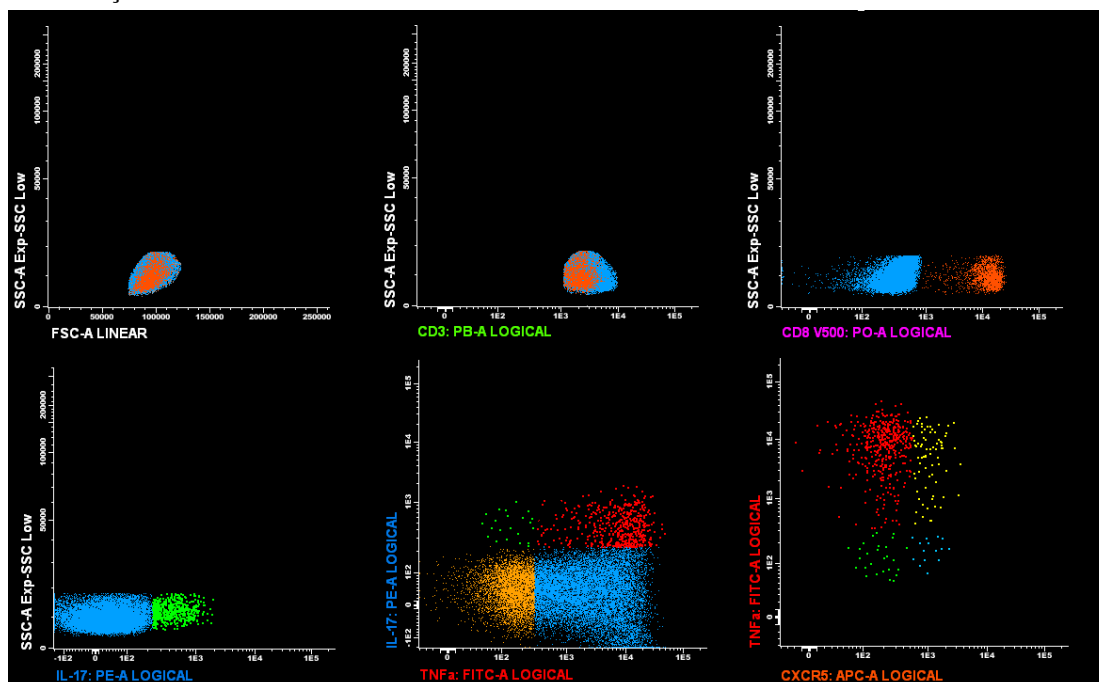
**Tabela 3.** Especificidade, clone e origem dos anticorpos monoclonais utilizados após aplicação da solução 2 do Kit Intraprep

Anticorpo Monoclonal	Clone	Fluorocromo	Marca	Localização	Adicionar ao tubo
<b>Anti-IL-17</b>	SCPL1362	Ficoeritrina	BD <i>Pharmingen</i>	EUA	nº 1, 2 e 3
<b>Anti-TNF-<math>\alpha</math></b>	MAb11	Isotiocianato de fluoresceína	BD <i>Pharmingen</i>	EUA	nº 1
<b>Anti-IFN-<math>\gamma</math></b>	4S.B3	Isotiocianato de fluoresceína	BD <i>Pharmingen</i>	EUA	nº 2
<b>Anti-IL-2</b>	MQ1-17H12	Isotiocianato de fluoresceína	BD <i>Pharmingen</i>	EUA	nº 3

Por fim, os tubos foram novamente lavados com 2 mL de PBS diluído a 1/10 em água destilada e centrifugados durante 5 minutos a 1500 rpm, com rejeição do sobrenadante. Ressuspenderam-se as células em 250 µl desse tampão.

### 3. Aquisição das amostras no citômetro de fluxo e análise dos resultados

A aquisição da amostra foi realizada no citômetro de fluxo FACS-Canto II (BDB, San José, Califórnia, EUA) com recurso à aplicação informática FACSDiva (BDB, San José, Califórnia, EUA), com aquisição mínima de 200.000 células, devido à pouca representação das células de interesse. Recorreu-se ao programa Infinicyt (Cytognos, Salamanca, Espanha) para se efetuar a análise dos dados obtidos no citômetro de fluxo. A figura 6 demonstra como foi efetuada a identificação das células em estudo.



**Figura 6.** Representação ilustrativa da identificação dos subtipos de células Th17 e Th1, Th1CXCR5<sup>+</sup> e Th1CXCR5<sup>-</sup> e expressão da citocina TNFα por cada um desses subtipos utilizando a seguinte combinação de anticorpos monoclonais: anti-CD3, anti-CD8, anti-CXCR5, anti-IL-17 e anti-TNFα. A identificação dos subtipos Tc17 e Tc1 foi feita do mesmo modo que os Th17 e Th1, mas dentro dos que marcaram CD8. A expressão das outras citocinas (IL-2 e IFNγ) foi feita do mesmo modo que o TNFα.

### 4. Análise Estatística

Os dados foram estatisticamente analisados através do uso do teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa SPSS 19.0 (IBM, New York, EUA) e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o *p-value* foi inferior a 0,05.



# III. Resultados



## 1. Frequência dos linfócitos Th17 e Tc17 no sangue periférico de doentes com Esclerose Sistémica

Os resultados referentes à frequência dos linfócitos Th17 e Tc17 e à quantidade de citocina IL-17 expressa pelos mesmos, dada pela MFI (do inglês *Mean Fluorescence Intensity*), tanto em SSc como no grupo controlo, encontram-se representados na tabela 4. Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados para os dois parâmetros anteriormente referidos.

## 2. Caracterização funcional das células Th17, Th1, Tc17 e Tc1 no sangue periférico de doentes com Esclerose Sistémica

Os resultados obtidos relativos à frequência de células Th17, Tc17, Th1 e Tc1 produtoras das citocinas IL-2, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  e à quantidade de cada citocina expressa por cada subtipo desses linfócitos (MFI) encontram-se representados na tabela 5, para os subtipos de SSc e grupo controlo, e nas figuras 7 e 8, para os grupos de duração da doença SSc.

### 2.1. Caracterização funcional das células Th17 e Tc17

Pela análise da tabela 5 verifica-se que existe um aumento significativo da frequência das células Th17 a produzir IL-2 em ambos os subtipos de SSc, e a produzir TNF $\alpha$  em SSc limitada, quando comparado com o grupo controlo. Já a frequência das células Th17 a produzir IFN $\gamma$ , embora não atinga significado estatístico, é maior no subtipo difuso da doença em relação ao grupo controlo.

Tal como ocorre com os linfócitos Th17, existe uma maior frequência de células Tc17 a produzir a citocina IL-2 em ambos os subtipos de SSc, em comparação com o grupo controlo, sendo esta frequência maior em SSc limitada do que em SSc difusa. Há também um aumento significativo de produção de citocina IL-2 por célula em SSc limitada. De forma idêntica ao ocorrido nos linfócitos Th17, a frequência de linfócitos Tc17 a produzir IFN $\gamma$  é maior em SSc difusa, embora não atinga significado estatístico.

Ao longo do tempo de duração da doença, não se verificam diferenças significativas ao nível da frequência das células Th17 e Tc17 a produzir as citocinas em estudo, nem ao nível da quantidade dessas citocinas produzidas por aquelas células.

**Tabela 4.** Frequência dos linfócitos T CD4, T CD8, Th17 e Tc17 no sangue periférico nos diferentes subtipos de SSc, e em função do tempo da doença após o seu diagnóstico, e no grupo controlo. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão da frequência de células Th17 do total de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, e de células Tc17 do total de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no sangue periférico, e das MFI da citocina IL-17 para cada um dos subtipos. Grupo 1: grupo de doentes com menos de 1 ano de duração da SSc. Grupo 2: grupo de doentes com duração da SSc entre 1 e 10 anos. Grupo 3, grupo de doentes com mais de 10 anos de duração da SSc

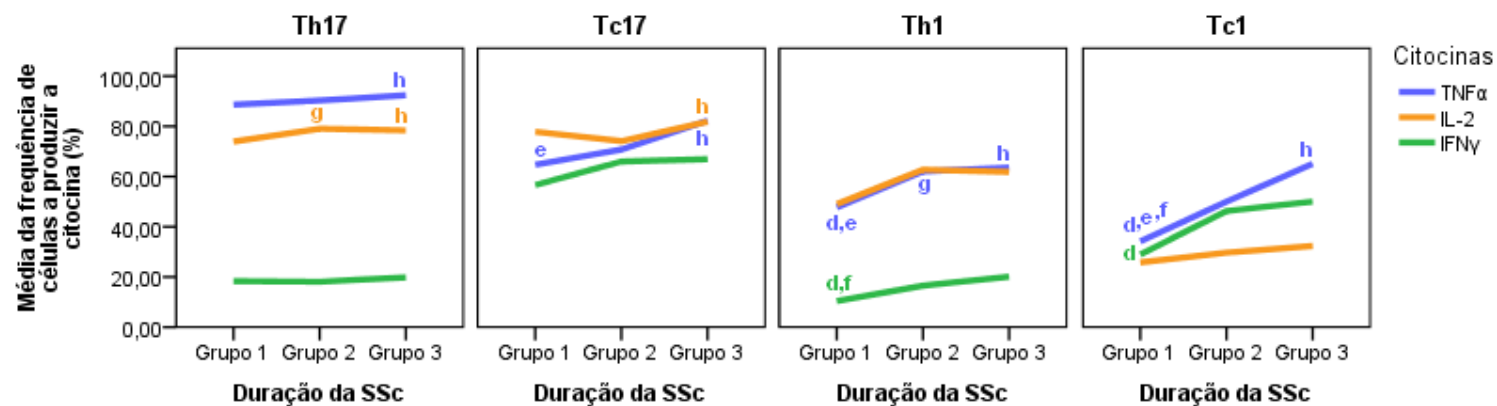
Linfócitos	% / MFI	Subtipo de SSc		Duração de SSc			Grupo controlo (n=20)
		Difuso (n=13)	Limitado (n=30)	Grupo 1 (n=6)	Grupo 2 (n=21)	Grupo 3 (n=16)	
Th17	% dentro dos linfócitos T CD4	0,929 $\pm$ 0,45	1,14 $\pm$ 0,66	0,891 $\pm$ 0,72	1,14 $\pm$ 0,65	1,02 $\pm$ 0,60	1,13 $\pm$ 0,41
	MFI de IL-17	364,52 $\pm$ 95,75	433,26 $\pm$ 79,33	404,89 $\pm$ 67,41	435,95 $\pm$ 74,52	422,77 $\pm$ 99,40	422,55 $\pm$ 105,4
Tc17	% dentro dos linfócitos T CD8	0,628 $\pm$ 0,42	0,626 $\pm$ 0,35	0,454 $\pm$ 0,34	0,658 $\pm$ 0,41	0,578 $\pm$ 0,32	0,580 $\pm$ 0,32
	MFI de IL-17	245,64 $\pm$ 29,53	264,04 $\pm$ 45,22	268,87 $\pm$ 64,54	270,99 $\pm$ 79,75	257,82 $\pm$ 38,80	266,20 $\pm$ 78,55

**Tabela 5.** Frequência (%) de células (Th17, Tc17, Th1 e Tc1) produtoras de citocinas e quantidade de citocina expressa por célula (MFI) nos diferentes subtipos da doença Esclerose Sistêmica e grupo controle, após estimulação *in vitro* dos linfócitos T. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

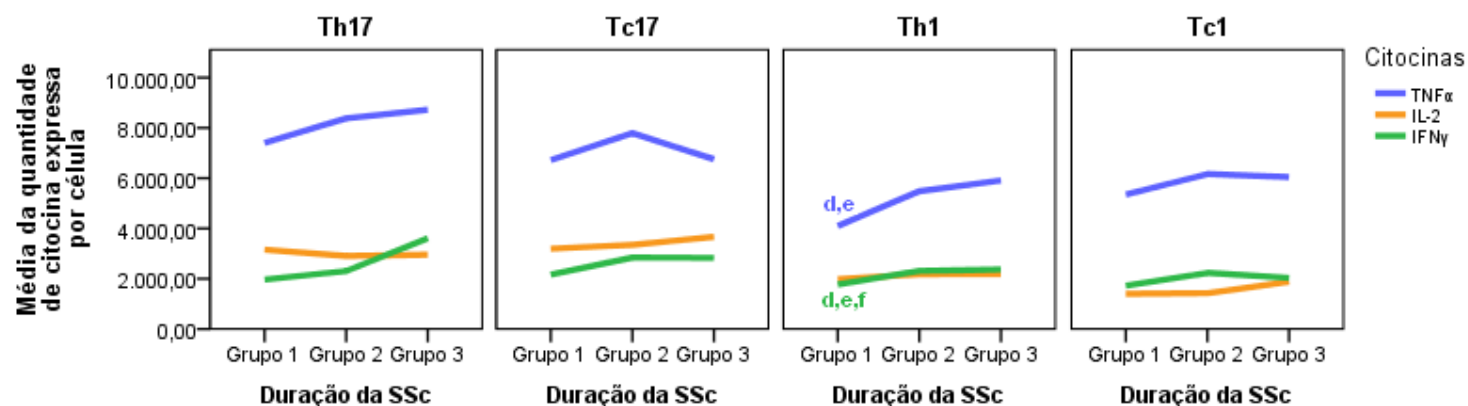
Linfó-citos	Cito-cinas	% / MFI	Subtipo de SSc		Grupo controle (n=20)
			Difuso (n=13)	Limitado (n=30)	
Th17	IL-2	%	78,79 $\pm$ 13,05 <sup>a, b</sup>	77,14 $\pm$ 6,350 <sup>c</sup>	68,09 $\pm$ 9,856
		MFI	3045 $\pm$ 739,2	2923 $\pm$ 856,7	2648 $\pm$ 460,6
	TNF $\alpha$	%	87,52 $\pm$ 10,88	91,51 $\pm$ 5,185 <sup>c</sup>	87,28 $\pm$ 6,782
		MFI	7785 $\pm$ 3389	8493 $\pm$ 2147	7388 $\pm$ 2636
	IFN $\gamma$	%	24,10 $\pm$ 16,13	17,32 $\pm$ 9,981	18,61 $\pm$ 13,95
		MFI	2728 $\pm$ 1029	2373 $\pm$ 1314	3087 $\pm$ 1411
Tc17	IL-2	%	71,42 $\pm$ 20,63	79,26 $\pm$ 18,68 <sup>c</sup>	62,10 $\pm$ 19,89
		MFI	2952 $\pm$ 1337	3595 $\pm$ 1482 <sup>c</sup>	2683 $\pm$ 866,6
	TNF $\alpha$	%	73,63 $\pm$ 16,25	74,74 $\pm$ 21,05	67,92 $\pm$ 22,94
		MFI	7050 $\pm$ 2538	7299 $\pm$ 2180	6609 $\pm$ 3006
	IFN $\gamma$	%	72,17 $\pm$ 19,31	62,31 $\pm$ 27,91	63,21 $\pm$ 19,79
		MFI	2577 $\pm$ 878,3	2774 $\pm$ 1296	3167 $\pm$ 1304
Th1	IL-2	%	57,06 $\pm$ 12,01	60,77 $\pm$ 12,16	57,23 $\pm$ 12,41
		MFI	2046 $\pm$ 461,1	2179 $\pm$ 674,3	2108 $\pm$ 623,0
	TNF $\alpha$	%	58,12 $\pm$ 15,56	60,11 $\pm$ 13,96	54,54 $\pm$ 10,05
		MFI	5180 $\pm$ 1924	5424 $\pm$ 2042	4926 $\pm$ 1304
	IFN $\gamma$	%	16,56 $\pm$ 9,859	16,84 $\pm$ 11,88	16,26 $\pm$ 4,773
		MFI	2076 $\pm$ 550,5	2288 $\pm$ 667,8	2421 $\pm$ 836,1
Tc1	IL-2	%	28,22 $\pm$ 10,97	30,51 $\pm$ 14,89	27,61 $\pm$ 10,38
		MFI	1284 $\pm$ 359,4	1714 $\pm$ 951,6	1296 $\pm$ 388,4
	TNF $\alpha$	%	52,42 $\pm$ 19,28	53,61 $\pm$ 20,32	44,86 $\pm$ 15,03
		MFI	5983 $\pm$ 1764	5918 $\pm$ 1524	5366 $\pm$ 1826
	IFN $\gamma$	%	47,31 $\pm$ 17,93	43,93 $\pm$ 22,28	40,04 $\pm$ 14,78
		MFI	1948 $\pm$ 594,88	2100 $\pm$ 755,6	2134 $\pm$ 683,2

As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o *p value* < 0,05:

<sup>a</sup> SSc difusa *versus* SSc limitada    <sup>b</sup> SSc difusa *versus* Controle    <sup>c</sup> SSc limitada *versus* Controle



**Figura 7.** Representação gráfica da média da frequência (%) dos linfócitos Th17, Tc17, Th1 e Tc1 a produzir as citocinas TNFα, IL-2 e IFNγ no sangue periférico de doentes com ≤1 ano de duração da SSc (Grupo 1), entre 1 e 10 anos de duração da SSc (grupo2) e com > 10 anos de duração da SSc (grupo 3). As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o *p-value* < 0,05: <sup>d</sup> Grupo 1 versus Grupo 2 <sup>e</sup> Grupo 1 versus Grupo 3 <sup>f</sup> Grupo 1 versus Controlo <sup>g</sup> Grupo 2 versus Controlo <sup>h</sup> Grupo 3 versus Controlo



**Figura 8.** Representação gráfica da quantidade das citocinas TNFα, IL-2 e IFNγ expressa pelos linfócitos Th17, Th1, Tc17 e Tc1 no sangue periférico de doentes com ≤1 ano de duração da SSc (Grupo 1), entre 1 e 10 anos de duração da SSc (grupo2) e com > 10 anos de duração da SSc (grupo 3). As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando *p-value* < 0,05: <sup>d</sup> Grupo 1 versus Grupo 2 <sup>e</sup> Grupo 1 versus Grupo 3 <sup>f</sup> Grupo 1 versus Controlo

## 2.2. Caracterização funcional das células Th1 e Tc1

Através da análise da tabela 5 verifica-se que, embora não se atinja significado estatístico, parece ocorrer uma maior frequência de células Th1, e principalmente de células Tc1, a produzir a citocina TNF $\alpha$  em ambos os subtipos de doença, em comparação com o grupo controlo.

Contudo é ao nível da duração de SSc que os resultados são significativos. Como podemos verificar pela figura 7, à medida que o tempo de duração da doença SSc é maior, a frequência de células Th1 e Tc1 a produzirem as citocinas TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  aumenta significativamente, sendo que esse aumento significativo é mais notório do primeiro ano da doença para os seguintes. Para além disso, a quantidade dessas citocinas produzidas pelos linfócitos Th1 é significativamente maior nos doentes com mais que um ano de duração da doença (figura 8). A frequência de células Th1 e Tc1 a produzirem a citocina IL-2 também aumenta ao longo do tempo da doença, mas sem atingir significado estatístico.

## 3. Frequência dos linfócitos Th17 CXCR5<sup>+</sup> e Th1 CXCR5<sup>+</sup> no sangue periférico de doentes com Esclerose Sistémica

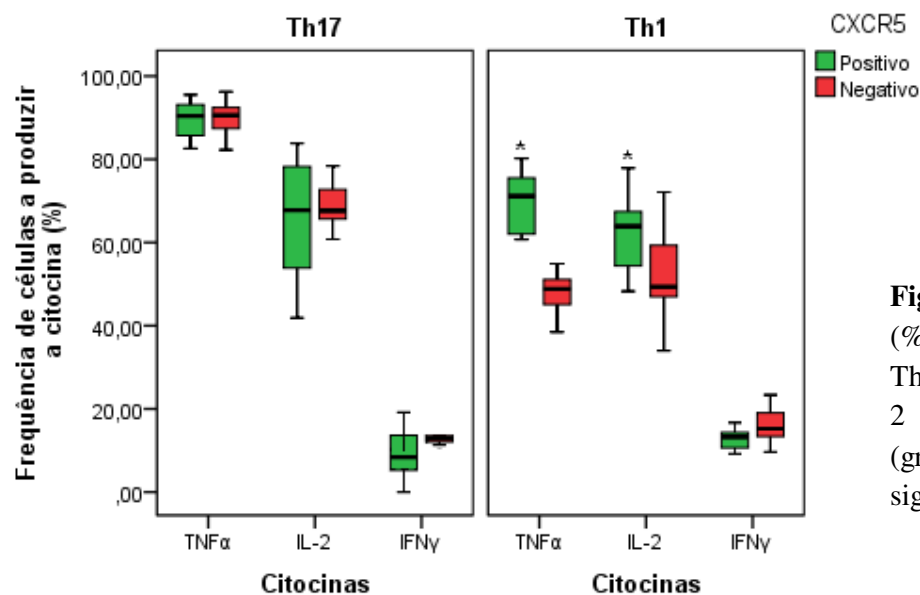
Os resultados referentes à frequência dos linfócitos Th17 CXCR5<sup>+</sup> e Th1 CXCR5<sup>+</sup> no sangue periférico, tanto em SSc como no grupo controlo, encontram-se representados na tabela 6. Não se verificaram alterações estatisticamente significativas na doença em estudo em nenhuma das frequências destes subtipos de linfócitos entre os grupos em estudo.

## 4. Caracterização funcional das células Th17 CXCR5<sup>+</sup>, Th17 CXCR5<sup>-</sup>, Th1 CXCR5<sup>+</sup> e Th1 CXCR5<sup>-</sup> no sangue periférico de doentes com Esclerose Sistémica e no grupo controlo

Antes de se proceder à caracterização funcional dos linfócitos Th17 CXCR5<sup>+</sup>, Th17 CXCR5<sup>-</sup>, Th1 CXCR5<sup>+</sup> e Th1 CXCR5<sup>-</sup>, foi-se primeiro avaliar se de facto os linfócitos Th17 CXCR5<sup>+</sup> e Th1 CXCR5<sup>+</sup> eram funcionalmente distintos dos linfócitos Th17 CXCR5<sup>-</sup> e Th1 CXCR5<sup>-</sup>, respetivamente. Para tal recorreu-se ao uso do teste não paramétrico Wilcoxon. Os resultados relativos às diferenças entre estas subpopulações estão representados em gráfico na figura 9, que ilustram a frequência de células a produzir as citocinas em estudo.

**Tabela 6.** Frequência dos linfócitos Th17 CXCR5<sup>+</sup> e Th1 CXCR5<sup>+</sup> no sangue periférico dos diferentes subtipos e grupos de duração da doença Esclerose Sistêmica com o grupo controlo. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão. % Th17, frequência de células Th17 CXCR5<sup>+</sup> do total de células Th17 do sangue periférico. % Th1, frequência de células Th1 CXCR5<sup>+</sup> do total de células Th1 do sangue periférico. Grupo 1: grupo de doentes com menos de 1 ano de duração da SSc. Grupo 2: grupo de doentes com duração da SSc entre 1 e 10 anos. Grupo 3, grupo de doentes com mais de 10 anos de duração da SSc.

Linfócitos	%	Subtipo de SSc		Duração da SSc			Grupo Controlo (n=20)
		Difuso (n=13)	Limitado (n=30)	Grupo 1 (n=6)	Grupo 2 (n=21)	Grupo 3 (n=16)	
Th17 CXCR5 <sup>+</sup>	% Th17	13,91 $\pm$ 7,73	12,23 $\pm$ 5,97	12,14 $\pm$ 3,24	12,42 $\pm$ 6,16	12,85 $\pm$ 8,24	14,72 $\pm$ 7,38
Th1 CXCR5 <sup>+</sup>	% Th1	16,07 $\pm$ 5,43	16,99 $\pm$ 5,85	13,25 $\pm$ 5,01	18,71 $\pm$ 5,45	15,99 $\pm$ 5,67	17,29 $\pm$ 5,90



**Figura 9.** Representação gráfica da mediana da frequência (%) dos linfócitos Th17 / Th1 CXCR5<sup>+</sup> (positivo) e Th17 / Th1 CXCR5<sup>-</sup> (negativo) a produzir as citocinas TNF $\alpha$ , IL-2 e IFN $\gamma$  no sangue periférico de indivíduos saudáveis (grupo controlo). As diferenças foram consideradas significativas (\*) quando o *p-value* < 0,05.



Os resultados obtidos demonstram que existem diferenças estatisticamente significativas entre a frequência de linfócitos Th1 CXCR5<sup>+</sup> e Th1 CXCR5<sup>-</sup> a produzirem as citocinas TNF $\alpha$  e IL-2. Já nas subpopulações Th17 CXCR5<sup>+</sup> e Th17 CXCR5<sup>-</sup> não se obtiveram diferenças estatisticamente significativas, não podendo por isso ser consideradas subpopulações diferentes a nível funcional.

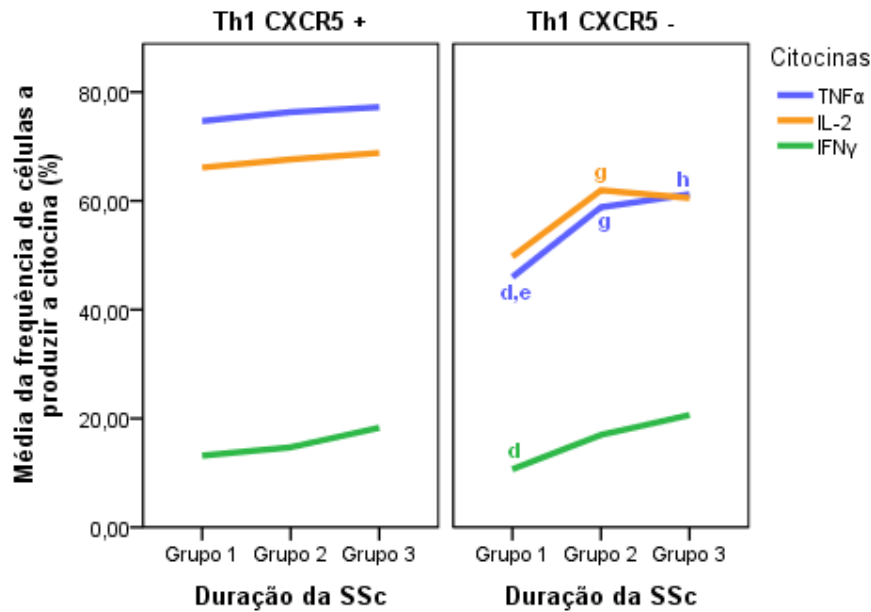
A diferença funcional entre as primeiras subpopulações verificada no grupo controlo também foi comprovada no grupo com SSc (resultados não apresentados). Neste sentido fomos comparar as diferentes subpopulações Th1 CXCR5<sup>+</sup> e Th1 CXCR5<sup>-</sup> nos diferentes grupos em estudo. Na tabela 7 e figuras 10 e 11 estão representados os dados obtidos relativos à frequência de células Th1 CXCR5<sup>+</sup> e Th1 CXCR5<sup>-</sup> produtoras das citocinas IL-2, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  e à quantidade de cada citocina expressa por cada subpopulação desses linfócitos, nos diferentes grupos estudados.

**Tabela 7.** Frequência (%) de células Th1 CXCR5<sup>+</sup> e Th1 CXCR5<sup>-</sup> produtoras de citocinas e quantidade de citocina expressa por célula (MFI) nos diferentes subtipos da doença Esclerose Sistémica e Controlos, após estímulo *in vitro* dos linfócitos T. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Linfó-citos	Cito-cinas	% / MFI	Subtipo de SSc		Grupo controlo (n=20)
			Difuso (n=13)	Limitado (n=30)	
Th1 CXCR5 <sup>+</sup>	IL-2	%	70,05 $\pm$ 9,972	67,12 $\pm$ 9,513	62,35 $\pm$ 9,559
		MFI	2087 $\pm$ 482,3	2192 $\pm$ 579,0	1861 $\pm$ 344,2
	TNF $\alpha$	%	80,48 $\pm$ 11,43 <sup>b</sup>	75,04 $\pm$ 9,281	70,06 $\pm$ 6,877
		MFI	4898 $\pm$ 1428	4842 $\pm$ 1454	4049 $\pm$ 784,9
	IFN $\gamma$	%	17,39 $\pm$ 9,890	15,44 $\pm$ 6,772	12,95 $\pm$ 2,433
		MFI	1745 $\pm$ 491,5	1692 $\pm$ 439,4	1473 $\pm$ 325,7
Th1 CXCR5 <sup>-</sup>	IL-2	%	58,82 $\pm$ 9,199	59,72 $\pm$ 12,93	52,95 $\pm$ 11,38
		MFI	2088 $\pm$ 506,8	2183 $\pm$ 707,2	1838 $\pm$ 338,2
	TNF $\alpha$	%	59,55 $\pm$ 12,70 <sup>b</sup>	57,24 $\pm$ 14,54 <sup>c</sup>	48,14 $\pm$ 4,893
		MFI	5899 $\pm$ 1731	5581 $\pm$ 2227	5152 $\pm$ 1239
	IFN $\gamma$	%	18,24 $\pm$ 10,47	17,26 $\pm$ 13,24	12,13 $\pm$ 4,407
		MFI	2181 $\pm$ 605,0	2399 $\pm$ 701,8	2041 $\pm$ 438,8

As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o *p-value* < 0,05:

<sup>a</sup> SSc difusa *versus* SSc limitada    <sup>b</sup> SSc difusa *versus* Controlo    <sup>c</sup> SSc limitada *versus* Controlo



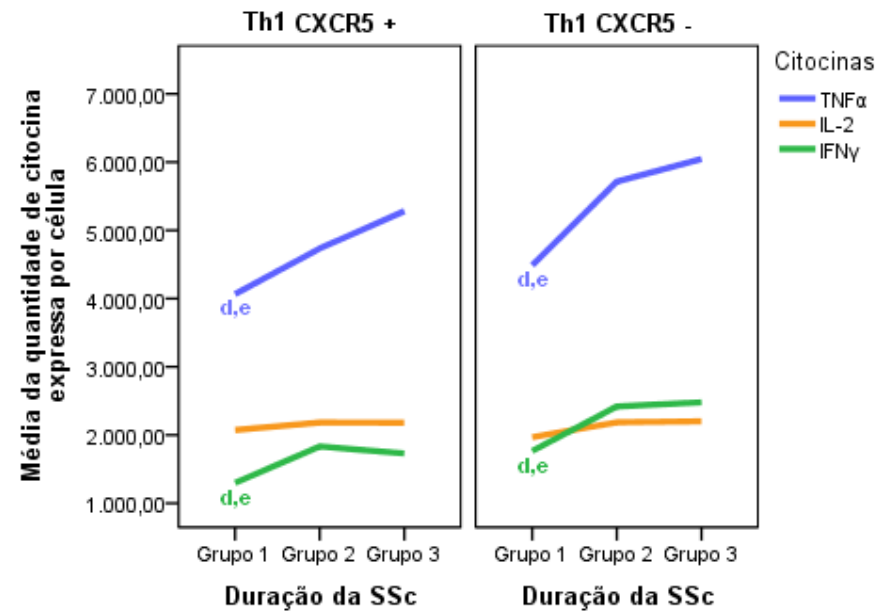
**Figura 10.** Representação gráfica da média da frequência (%) dos linfócitos Th1 CXCR5<sup>+</sup> e Th1 CXCR5<sup>-</sup> a produzir as citocinas TNFα, IL-2 e IFNγ no sangue periférico de doentes com ≤1 ano de duração da SSc (Grupo 1), entre 1 e 10 anos de duração da SSc (grupo2) e com > 10 anos de duração da SSc (grupo 3). As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o *p value* < 0,05:

<sup>d</sup> Grupo 1 versus Grupo 2

<sup>e</sup> Grupo 1 versus Grupo 3

<sup>g</sup> Grupo 2 versus Controlo

<sup>h</sup> Grupo 3 versus Controlo



**Figura 11.** Representação gráfica da média da quantidade das citocinas TNFα, IL-2 e IFNγ expressa pelos linfócitos Th1 CXCR5<sup>+</sup> e Th1 CXCR5<sup>-</sup> no sangue periférico de doentes com ≤1 ano de duração da SSc (Grupo 1), entre 1 e 10 anos de duração da SSc (grupo2) e com > 10 anos de duração da SSc (grupo 3). As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando *p value* < 0,05:

<sup>d</sup> Grupo 1 versus Grupo 2

<sup>e</sup> Grupo 1 versus Grupo 3

#### 4.1. Caracterização funcional das células Th1 CXCR5<sup>+</sup> e Th1 CXCR5<sup>-</sup>

Pela análise da tabela 7 verifica-se que existe um aumento significativo da frequência dos linfócitos Th1 CXCR5<sup>+</sup> e Th1 CXCR5<sup>-</sup> a expressar a citocina TNF $\alpha$  em ambos os subtipos de SSc, em relação ao grupo controlo. O mesmo acontece para a citocina IL-2 apesar de não atingir significado estatístico.

A figura 10 demonstra-nos que frequência de células Th1 CXCR5<sup>+</sup> a produzir as citocinas em estudo mantém-se constante, e que a frequência de células Th1 CXCR5<sup>-</sup> a produzir TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  aumenta significativamente após o primeiro ano da doença SSc. Em ambos os subtipos de linfócitos verificou-se ainda que a quantidade de TNF $\alpha$  e de IFN $\gamma$  por eles produzida também aumenta significativamente do primeiro ano da doença para os seguintes.



## IV. Discussão



A Esclerose Sistémica, uma doença reumática autoimune sistémica do tecido conjuntivo, é uma doença caracterizada por anormalidades vasculares, uma desregulação do sistema imune e uma fibrose tecidual generalizada. Esta doença tem a si associada uma elevada mortalidade e morbilidade. Contudo, para além dos estudos envolvendo esta doença serem difíceis de realizar por ser uma doença rara, existem algumas contradições no que toca ao esclarecimento da sua etiologia e fisiopatologia.

Ao nível do sistema imune, os novos subtipos de linfócitos Th17 e Tc17 e os que se caracterizam pela expressão do recetor CXCR5 têm sido implicados em diversas patologias do tipo autoimune. No entanto os estudos do seu papel na SSc são escassos e ainda muito especulativos. Assim sendo o objetivo principal deste trabalho foi quantificar e caracterizar funcionalmente os linfócitos Th17, Th1, Tc17 e Tc1 pela produção das citocinas IL-17, IL-2, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  no sangue periférico de doentes com SSc.

### **1. Frequência dos linfócitos Th17 e Tc17 no sangue periférico de doentes com Esclerose Sistémica**

Os linfócitos Th17 e Tc17 são dois subtipos de linfócitos que se caracterizam essencialmente pela produção da citocina IL-17. Esta interleucina tem um carácter pró-inflamatório, induz o recrutamento de outras células, como os neutrófilos, e desencadeia a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias por várias células. A diferenciação dos linfócitos Th17 e Tc17 é regulada pela ativação do factor de transcrição RORC2 que é, por sua vez, ativado pelo fator de transcrição STAT3. A expressão deste último é favorecida pela ação das interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-21, IL-23 e IL-6. Pelo facto destes subtipos celulares produzirem essencialmente citocinas pró-inflamatórias, eles estão comumente associados ao desenrolar de inflamação e, nos últimos anos, têm sido implicados no desenvolvimento de doenças autoimunes.

Dentro dos poucos estudos que foram realizados envolvendo a determinação da citocina IL-17 nesta doença, a maior parte refere que esta se encontra aumentada no soro/plasma de indivíduos com SSc, em relação a indivíduos saudáveis [162, 163]. No entanto neste trabalho não se observaram diferenças estatisticamente significativas na frequência de células Th17 e Tc17 dentro das células T CD4 e T CD8, respetivamente, entre os grupos em estudo, tendo-se o mesmo verificado para a quantidade de citocina IL-17 produzida por célula.

É de se notar que a quantidade de IL-17 no soro/plasma não está diretamente relacionada com as células Th17 e Tc17 em circulação. De facto, existem outros subtipos celulares que produzem a citocina IL-17, sendo exemplos os linfócitos T  $\gamma\delta$  [169, 170] e os linfócitos NK [171]. Assim estes linfócitos podem também estar a contribuir para o aumento da citocina IL-17 no soro e/ou plasma de indivíduos afetados pela doença em estudo, não parecendo que esse aumento seja apenas devido aos linfócitos Th17 e Tc17.

Contudo os resultados aqui apresentados não estão de acordo com três estudos publicados recentemente que referem que a frequência dos linfócitos Th17 no sangue periférico de doentes com SSc está aumentada em comparação com indivíduos saudáveis [131, 164, 165]. A diferença destes resultados com os aqui obtidos pode ser explicada pelo diferente número de doentes estudados e pelas diferentes características clínicas que estes possuem. Para além disso a estratégia utilizada por esses investigadores para caracterizar e quantificar as células Th17 foi diferente da utilizada neste estudo, o que dificulta a comparação dos resultados. O envolvimento das Tc17 na SSc ainda não está representado na literatura mas em princípio será em tudo parecido às Th17.

## **2. Caracterização funcional das células Th17 e Tc17 no sangue periférico de doentes com SSc**

Os dados relativos à caracterização funcional das células Th17 e Tc17 em SSc (tabela 5) evidenciam que a frequência destes linfócitos a produzir a citocina IL-2 é maior nos doentes afetados pela doença em estudo do que em indivíduos saudáveis. Para além disto a frequência dos linfócitos Th17 produtores de TNF $\alpha$  está também aumentada em SSc limitada.

Ao longo do tempo de duração da doença não se verificaram resultados estatisticamente significativos, quer na frequência de linfócitos Th17 e Tc17 a produzir as citocinas em estudo, quer na quantidade dessas citocinas produzidas por célula.

Estes resultados sugerem um envolvimento dos linfócitos Th17 e Tc17 na Esclerose Sistémica. Apesar de, como vimos anteriormente, o número de células Th17 e Tc17 no sangue periférico ser igual entre os grupos em estudo, a nível funcional estas células parecem estar mais ativas em SSc já que a sua frequência a produzir aquelas citocinas é maior em indivíduos afetados pela doença. De facto as citocinas que favorecem a expressão de STAT3, como por exemplo a IL-1 $\beta$ , a IL-6 e a IL-23, que, por sua vez, induz



a ativação dos linfócitos Th17 e Tc17 através do fator de transcrição RORC2, estão aumentadas no plasma de indivíduos com SSc [160, 172].

Além disso, os dados obtidos demonstram que os linfócitos Th17/Tc17 apresentam uma maior frequência de células a produzir as citocinas características dos linfócitos Th1/Tc1. De facto vários estudos, após a descoberta dos linfócitos Th17, têm demonstrado que estas células parecem possuir plasticidade, isto é, uma capacidade de se converterem em células do tipo Th17 que produzem citocinas do tipo Th1; devido a este facto elas foram designadas de células “Th17/Th1” [54, 55]. Os resultados aqui obtidos demonstram que parece haver, em Esclerose Sistémica, um aumento da plasticidade das células Th17 em direção a um fenótipo Th1, pois a frequência daquelas células a produzir as citocinas características das células Th1 está aumentada em indivíduos com a doença em estudo. Estudos realizados recentemente em outras doenças autoimunes também verificaram um aumento da plasticidade Th17/Th1 [170, 173]. Note-se que esta plasticidade não é exclusiva para a aquisição de um fenótipo Th1; os linfócitos Th17 parecem também converter-se em linfócitos T reguladores [56].

Estes linfócitos podem assim estar a contribuir para um agravamento de SSc, quer ao nível da inflamação, quer ao nível da fibrose, uma vez que as citocinas TNF $\alpha$  e IL-2 são bastante indutoras da inflamação, e que o TNF $\alpha$  estimula a síntese de colagénio na presença de TGF $\beta$  [118, 154], citocina que se encontra aumentada nesta doença. Para além disso as citocinas produzidas por estes linfócitos agravam ainda mais a inflamação pelo recrutamento dos neutrófilos para o local da inflamação. De facto existem estudos que comprovam que estes neutrófilos estão numericamente aumentados na pele de doentes com SSc [72].

Tudo isso leva a crer que os linfócitos Th17 e Tc17 têm um papel importante, a nível funcional, no desenrolar da doença SSc. Assim sendo, o bloqueio das citocinas indutoras destes subtipos celulares pode fornecer uma ferramenta útil na intervenção clínica da progressão da SSc.

### **3. Caracterização funcional das células Th1 e Tc1 no sangue periférico de doentes com Esclerose Sistémica**

Não foram verificadas alterações significativas relativamente à frequência de linfócitos Th1 e Tc1 a produzirem as citocinas IL-2, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , entre os subtipos de

SSc e o grupo controlo (tabela 6). Contrariamente, a variação ao longo do tempo da doença é significativa: há uma maior frequência de células Th1 e Tc1 a produzir as citocinas TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  quando maior o tempo de duração da doença (tabela 6 e figura 7). Mais se verifica que a frequência destas células a produzir as citocinas em estudo no primeiro ano da doença (grupo 1) está diminuída em relação a indivíduos saudáveis.

Parece então que no início da doença há uma contração da resposta imune por parte dos linfócitos Th1 e Tc1, o que indica que estes subtipos linfocitários não são os principais intervenientes do início da progressão da doença em estudo. Contudo eles passam a estar mais ativos após o primeiro ano da doença, principalmente os linfócitos Tc1, pois a sua frequência a produzir as citocinas em estudo aumenta com um aumento da duração da doença. De facto a IL-12, uma citocina que induz a ativação destes linfócitos, aparenta estar diminuída no início da doença, aumentando com o aumento dos anos de duração da mesma [174], o que se correlaciona com o facto de um maior número de linfócitos Th1 e Tc1 ficar mais ativo com o aumento do tempo da doença.

Com o aumento da duração da doença há então mais subtipos de linfócitos a produzir as citocinas IL-2, TNF $\alpha$ : os Th17 e Tc17, como vimos anteriormente, e os Th1 e Tc1. Assim sendo, enquanto os linfócitos Th17 e Tc17 parecem desencadear o desenvolvimento de inflamação e da fibrose característica desta doença, os linfócitos Th1 e Tc1 parecem agravar estas características com o tempo, pois há um aumento destes subtipos linfocitários a produzir as citocinas que levam às características descritas da SSc. A resposta imune torna-se mais intensa instalando-se uma inflamação crónica.

#### **4. Frequência dos linfócitos Th17 CXCR5<sup>+</sup> e Th1 CXCR5<sup>+</sup> no sangue periférico de doentes com Esclerose Sistémica**

Os linfócitos que se caracterizam pela expressão de CXCR5 à sua superfície têm sido designados por alguns autores por células T auxiliares foliculares (Tfh) e estão essencialmente localizados nos centros germinativos dos órgãos linfoides secundários. Aí eles promovem a diferenciação dos linfócitos B em células B de memória e células plasmáticas após contacto do recetor CXCR5 com o seu ligando CXCL13. Ainda não é bem perceptível se existe um equivalente periférico destes linfócitos e se eles podem ser distinguidos nos diferentes subtipos de linfócitos Th. Contudo, apesar de escassos, estudos recentes têm demonstrado que estas suposições são de algum modo verdadeiras.

Os resultados exibidos na tabela 6 indicam à partida que de facto existem subtipos de linfócitos Th1 e Th17 do sangue periférico que expressam CXCR5. Contudo a percentagem de linfócitos Th1 e Th17 que expressam CXCR5 no sangue periférico é igual entre os grupos de SSc estudados e o grupo controlo, pois não existiram diferenças significativas entre estes grupos.

Embora, devido à novidade do assunto, sejam muito raros os estudos que envolvam os diferentes subtipos de linfócitos T CD4+ que expressem CXCR5 em autoimunidade, existem dois estudos recentes que contrariam os resultados aqui obtidos. Eles mencionam que os linfócitos Th17 CXCR5<sup>+</sup> estão, em termos numéricos, aumentados no sangue de indivíduos afetados por Síndrome de Sjögren [115] e em Dermatomiosite Juvenil [78].

Seguidamente foi-se averiguar se os linfócitos Th17 CXCR5<sup>+</sup> e Th1 CXCR5<sup>+</sup> eram funcionalmente distintos dos linfócitos Th17 CXCR5<sup>-</sup> e Th1 CXCR5<sup>-</sup>, respetivamente, no grupo controlo. Relativamente aos linfócitos Th17, não existiram diferenças funcionais entre os subtipos Th17 CXCR5<sup>+</sup> e Th17 CXCR5<sup>-</sup> pois ambos se caracterizaram pela mesma frequência de células produtoras das citocinas em estudo (figura 9). Contrariamente verificámos que as subpopulações Th1 CXCR5<sup>+</sup> e Th1 CXCR5<sup>-</sup> são diferentes a nível funcional, pois a frequência dos linfócitos Th1 CXCR5<sup>+</sup> a produzir as citocinas TNF $\alpha$  e IL-2 está significativamente aumentada em relação à frequência dos linfócitos Th1 CXCR5<sup>-</sup> produtores dessas citocinas. Deste modo apenas fez sentido neste trabalho caracterizar, a nível funcional, as diferentes subpopulações Th1 CXCR5<sup>+</sup> e Th1 CXCR5<sup>-</sup> nos diferentes grupos em estudo.

## 5. Caracterização funcional das células Th1 CXCR5<sup>+</sup> e Th1 CXCR5<sup>-</sup>

Relativamente às subpopulações Th1 CXCR5<sup>-</sup>, verificou-se que a sua frequência a produzir TNF $\alpha$  está significativamente aumentada em SSc comparativamente com o grupo controlo, independentemente do subtipo da doença (tabela 7). Já a frequência da subpopulação Th1 CXCR5<sup>+</sup> a produzir TNF $\alpha$  está significativamente aumentada no subtipo diuso. Embora não se tenha atingido significado estatístico, a frequência destas células a produzir IL-2 parece seguir o mesmo padrão que o obtido para o TNF $\alpha$ .

Apesar de ao nível da caracterização dos linfócitos Th1 não se terem verificado diferenças entre os subtipos da doença em estudo, quando olhamos para a subpopulação Th1 CXCR5<sup>+</sup>, parece que se observam diferenças entre os dois subtipos da doença. É que

no subtipo difuso da doença, a frequência destes linfócitos a expressar TNF $\alpha$  e IL-2 é maior. Isto era de certo modo esperado pois, como já referido, o TNF $\alpha$  estimula a síntese de colagénio na presença de TGF $\beta$ , isto é, estimula a fibrose, e esta é de facto mais intensa e generalizada no subtipo difuso da SSc.

A proliferação das células B e a secreção de imunoglobulinas por estas células é bastante mediada pela citocina IL-2 produzida pelos linfócitos Th presentes nos folículos [175, 176]. Caso os linfócitos Th1 CXCR5<sup>+</sup> que estão presentes no sangue periférico sejam de facto um equivalente periférico ou uma célula precursora das células Th foliculares, eles vão se deslocar para os tecidos linfoides secundários e ativar as células B. Como uma maior frequência desses linfócitos em SSc, para além de TNF $\alpha$ , está a produzir IL-2, pode haver uma maior ativação das células B e uma maior secreção de imunoglobulinas pelas mesmas, contribuindo desta forma para o fenómeno de autoimunidade. Para além disso o aumento de imunoglobulinas em circulação pode levar à formação de imunocomplexos e ao seu depósito em vários locais do corpo, o que induz inflamação [1, 2, 4, 177]. O aumento da frequência dos linfócitos Th1 CXCR5<sup>+</sup> a produzir as citocinas TNF $\alpha$  e IL-2 pode estar assim associado a um pior prognóstico em SSc.

Em relação ao tempo de duração da doença, a frequência dos linfócitos Th1 CXCR5<sup>+</sup> a produzir as citocinas mantém-se relativamente constante com o tempo. Isto é de certo modo esperado pois, se estas células são um precursor de Tfh, após ativadas elas migram para os órgãos linfoides secundários para estimular as células B. Já frequência do subtipo Th1 CXCR5<sup>-</sup> a produzir as citocinas TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  aumenta significativamente do primeiro ano da doença para os seguintes, representando o que ocorre com os linfócitos Th1 no geral.

Contudo, ambos os subtipos demonstram produzir uma quantidade significativamente maior de TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  após o primeiro ano da doença em estudo, o que pode significar um maior limiar de ativação das células Th1 CXCR5<sup>+</sup> e o seu maior envolvimento na interação das células B nos centros germinativos dos órgãos linfoides secundários. Para além disso estas, em conjunto com os linfócitos Th1 CXCR5<sup>-</sup>, favorecem um aumento da quantidade das citocinas pró-inflamatórias TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  ao nível periférico, o que pode levar a um agravamento da inflamação característica da doença.

# V. Conclusão



Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que as células Th17 e as células Th1 estão, do ponto de vista funcional, alteradas em SSc, particularmente ao nível da frequência destas células a produzir IL-2 ou TNF $\alpha$ , o que aponta para o seu envolvimento na fisiopatologia e/ou progressão da doença.

A frequência das células Th1 produtoras de TNF $\alpha$  ou IL-2 que expressam CXCR5, pode ser um bom marcador para discriminar os subtipos limitado e difuso da SSc, o que reforça a ideia do envolvimento dos linfócitos Th na doença, particularmente na sua interação com as células B.

Estudos mais alargados e envolvendo um maior número de doentes são necessários para que se possa clarificar melhor os principais achados encontrados neste trabalho.





## **VI. Bibliografia**



1. Arosa, F., E.M. Cardoso, and F.C. Pacheco, *Fundamentos de Imunologia* 2007, Lisbon: LIDEL - Edições Técnicas. 339.
2. Goldsby, R., T. Kindt, and B. Osborne, *Kuby Immunology*. 6th ed 2006. 553.
3. Abbas, A.K., A. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and Molecular Immunology*. 6th ed 2007. 575.
4. Virella, G., *Medical Immunology*. 5th ed 2001, New York: Marcel Dekker, Inc.
5. Hoffbrand, A.V., P.A.H. Moss, and J.E. Pettit, *Essential Haematology*. 6th ed 2006: Blackwell. 379.
6. Harrison, T., *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 16th ed 2005. 2783.
7. Bihl, F., C. Germain, C. Luci, and V.M. Braud, *Mechanisms of NK cell activation: CD4(+) T cells enter the scene*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(21): p. 3457-67.
8. Sun, J.C. and L.L. Lanier, *NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8 T cells*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(10): p. 645-57.
9. Lunemann, A., J.D. Lunemann, and C. Munz, *Regulatory NK-cell functions in inflammation and autoimmunity*. Mol Med, 2009. **15**(9-10): p. 352-8.
10. Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y.J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka, *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 767-811.
11. Crivellato, E., A. Vacca, and D. Ribatti, *Setting the stage: an anatomist's view of the immune system*. Trends Immunol, 2004. **25**(4): p. 210-7.
12. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immunity*. N Engl J Med, 2000. **343**(5): p. 338-44.
13. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Innate immunity: impact on the adaptive immune response*. Curr Opin Immunol, 1997. **9**(1): p. 4-9.
14. Ellmeier, W., S. Sawada, and D.R. Littman, *The regulation of CD4 and CD8 coreceptor gene expression during T cell development*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 523-54.
15. Krogsgaard, M. and M.M. Davis, *How T cells 'see' antigen*. Nat Immunol, 2005. **6**(3): p. 239-45.
16. Rengarajan, J., S.J. Szabo, and L.H. Glimcher, *Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization*. Immunol Today, 2000. **21**(10): p. 479-83.
17. Annunziato, F., L. Cosmi, F. Liotta, E. Maggi, and S. Romagnani, *The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation*. Int Immunol, 2008. **20**(11): p. 1361-8.
18. Romagnani, S., E. Maggi, F. Liotta, L. Cosmi, and F. Annunziato, *Properties and origin of human Th17 cells*. Mol Immunol, 2009. **47**(1): p. 3-7.
19. Liu, Y.J., H. Kanzler, V. Soumelis, and M. Gillet, *Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation*. Nat Immunol, 2001. **2**(7): p. 585-9.
20. Acosta-Rodriguez, E.V., L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattorno, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, and G. Napolitani, *Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(6): p. 639-46.
21. Romagnani, S., *Human Th17 cells*. Arthritis Res Ther, 2008. **10**(2): p. 206.
22. de Jong, E., T. Suddason, and G.M. Lord, *Translational mini-review series on Th17 cells: development of mouse and human T helper 17 cells*. Clin Exp Immunol, 2010. **159**(2): p. 148-58.

23. Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher, *Functional diversity of helper T lymphocytes*. Nature, 1996. **383**(6603): p. 787-93.
24. Glimcher, L.H. and K.M. Murphy, *Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up*. Genes Dev, 2000. **14**(14): p. 1693-711.
25. Romagnani, S., *The Th1/Th2 paradigm*. Immunol Today, 1997. **18**(6): p. 263-6.
26. Harrington, L.E., R.D. Hatton, P.R. Mangan, H. Turner, T.L. Murphy, K.M. Murphy, and C.T. Weaver, *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
27. Annunziato, F., L. Cosmi, V. Santarlasci, L. Maggi, F. Liotta, B. Mazzinghi, E. Parente, L. Fili, S. Ferri, F. Frosali, F. Giudici, P. Romagnani, P. Parronchi, F. Tonelli, E. Maggi, and S. Romagnani, *Phenotypic and functional features of human Th17 cells*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1849-61.
28. Tesmer, L.A., S.K. Lundy, S. Sarkar, and D.A. Fox, *Th17 cells in human disease*. Immunol Rev, 2008. **223**: p. 87-113.
29. Wilson, N.J., K. Boniface, J.R. Chan, B.S. McKenzie, W.M. Blumenschein, J.D. Mattson, B. Basham, K. Smith, T. Chen, F. Morel, J.C. Lecron, R.A. Kastelein, D.J. Cua, T.K. McClanahan, E.P. Bowman, and R. de Waal Malefyt, *Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(9): p. 950-7.
30. Acosta-Rodriguez, E.V., G. Napolitani, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto, *Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(9): p. 942-9.
31. Volpe, E., N. Servant, R. Zollinger, S.I. Bogiatzi, P. Hupe, E. Barillot, and V. Soumelis, *A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses*. Nat Immunol, 2008. **9**(6): p. 650-7.
32. Chen, Z., C.M. Tato, L. Muul, A. Laurence, and J.J. O'Shea, *Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes*. Arthritis and Rheumatism, 2007. **56**(9): p. 2936-46.
33. Yang, L., D.E. Anderson, C. Baecher-Allan, W.D. Hastings, E. Bettelli, M. Oukka, V.K. Kuchroo, and D.A. Hafler, *IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells*. Nature, 2008. **454**(7202): p. 350-2.
34. Manel, N., D. Unutmaz, and D.R. Littman, *The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma*. Nat Immunol, 2008. **9**(6): p. 641-9.
35. Crome, S.Q., A.Y. Wang, C.Y. Kang, and M.K. Levings, *The role of retinoic acid-related orphan receptor variant 2 and IL-17 in the development and function of human CD4+ T cells*. Eur J Immunol, 2009. **39**(6): p. 1480-93.
36. Ramgolam, V.S., Y. Sha, J. Jin, X. Zhang, and S. Markovic-Plese, *IFN-beta inhibits human Th17 cell differentiation*. J Immunol, 2009. **183**(8): p. 5418-27.
37. Nakae, S., Y. Iwakura, H. Suto, and S.J. Galli, *Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell differentiation by IL-17*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(5): p. 1258-68.
38. Santarlasci, V., L. Maggi, M. Capone, F. Frosali, V. Querci, R. De Palma, F. Liotta, L. Cosmi, E. Maggi, S. Romagnani, and F. Annunziato, *TGF-beta indirectly favors*

- the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells.* Eur J Immunol, 2009. **39**(1): p. 207-15.
39. Ivanov, II, B.S. McKenzie, L. Zhou, C.E. Tadokoro, A. Lepelley, J.J. Lafaille, D.J. Cua, and D.R. Littman, *The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells.* Cell, 2006. **126**(6): p. 1121-33.
  40. Burgler, S., N. Ouaked, C. Bassin, T.M. Basinski, P.Y. Mantel, K. Siegmund, N. Meyer, C.A. Akdis, and C.B. Schmidt-Weber, *Differentiation and functional analysis of human T(H)17 cells.* J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(3): p. 588-95, 595 e1-7.
  41. Ma, C.S., G.Y. Chew, N. Simpson, A. Priyadarshi, M. Wong, B. Grimbacher, D.A. Fulcher, S.G. Tangye, and M.C. Cook, *Deficiency of Th17 cells in hyper IgE syndrome due to mutations in STAT3.* J Exp Med, 2008. **205**(7): p. 1551-7.
  42. Crome, S.Q., A.Y. Wang, and M.K. Levings, *Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease.* Clin Exp Immunol, 2010. **159**(2): p. 109-19.
  43. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Human Th17 cells in infection and autoimmunity.* Microbes Infect, 2009. **11**(5): p. 620-4.
  44. Benwell, R.K. and D.R. Lee, *Essential and synergistic roles of IL1 and IL6 in human Th17 differentiation directed by TLR ligand-activated dendritic cells.* Clin Immunol, 2010. **134**(2): p. 178-87.
  45. Boniface, K., B. Blom, Y.J. Liu, and R. de Waal Malefyt, *From interleukin-23 to T-helper 17 cells: human T-helper cell differentiation revisited.* Immunol Rev, 2008. **226**: p. 132-46.
  46. Weaver, C.T., R.D. Hatton, P.R. Mangan, and L.E. Harrington, *IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages.* Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 821-52.
  47. Kuestner, R.E., D.W. Taft, A. Haran, C.S. Brandt, T. Brender, K. Lum, B. Harder, S. Okada, C.D. Ostrander, J.L. Kreindler, S.J. Aujla, B. Reardon, M. Moore, P. Shea, R. Schreckhise, T.R. Bukowski, S. Presnell, P. Guerra-Lewis, J. Parrish-Novak, J.L. Ellsworth, S. Jaspers, K.E. Lewis, M. Appleby, J.K. Kolls, M. Rixon, J.W. West, Z. Gao, and S.D. Levin, *Identification of the IL-17 receptor related molecule IL-17RC as the receptor for IL-17F.* J Immunol, 2007. **179**(8): p. 5462-73.
  48. Kolls, J.K. and A. Linden, *Interleukin-17 family members and inflammation.* Immunity, 2004. **21**(4): p. 467-76.
  49. Pelletier, M., L. Maggi, A. Micheletti, E. Lazzeri, N. Tamassia, C. Costantini, L. Cosmi, C. Lunardi, F. Annunziato, S. Romagnani, and M.A. Cassatella, *Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells.* Blood, 2010. **115**(2): p. 335-43.
  50. Unutmaz, D., *RORC2: the master of human Th17 cell programming.* Eur J Immunol, 2009. **39**(6): p. 1452-5.
  51. Cosmi, L., R. De Palma, V. Santarasci, L. Maggi, M. Capone, F. Frosali, G. Rodolico, V. Querci, G. Abbate, R. Angeli, L. Berrino, M. Fambrini, M. Caproni, F. Tonelli, E. Lazzeri, P. Parronchi, F. Liotta, E. Maggi, S. Romagnani, and F. Annunziato, *Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor.* J Exp Med, 2008. **205**(8): p. 1903-16.

52. Singh, S.P., H.H. Zhang, J.F. Foley, M.N. Hedrick, and J.M. Farber, *Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6*. J Immunol, 2008. **180**(1): p. 214-21.
53. Annunziato, F., L. Cosmi, F. Liotta, E. Maggi, and S. Romagnani, *Human Th17 cells: are they different from murine Th17 cells?* Eur J Immunol, 2009. **39**(3): p. 637-40.
54. Boniface, K., W.M. Blumenschein, K. Brovont-Porth, M.J. McGeachy, B. Basham, B. Desai, R. Pierce, T.K. McClanahan, S. Sadekova, and R. de Waal Malefyt, *Human Th17 cells comprise heterogeneous subsets including IFN-gamma-producing cells with distinct properties from the Th1 lineage*. J Immunol, 2010. **185**(1): p. 679-87.
55. Zhou, L., M.M. Chong, and D.R. Littman, *Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 646-55.
56. Peck, A. and E.D. Mellins, *Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example*. Immunology, 2010. **129**(2): p. 147-53.
57. Johnston, R.J., A.C. Poholek, D. DiToro, I. Yusuf, D. Eto, B. Barnett, A.L. Dent, J. Craft, and S. Crotty, *Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation*. Science, 2009. **325**(5943): p. 1006-10.
58. Vinuesa, C.G., S.G. Tangye, B. Moser, and C.R. Mackay, *Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(11): p. 853-65.
59. King, C., *New insights into the differentiation and function of T follicular helper cells*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(11): p. 757-66.
60. Schaerli, P., K. Willimann, A.B. Lang, M. Lipp, P. Loetscher, and B. Moser, *CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function*. J Exp Med, 2000. **192**(11): p. 1553-62.
61. Breitfeld, D., L. Ohl, E. Kremmer, J. Ellwart, F. Sallusto, M. Lipp, and R. Forster, *Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production*. J Exp Med, 2000. **192**(11): p. 1545-52.
62. Lohning, M., A. Hutloff, T. Kallinich, H.W. Mages, K. Bonhagen, A. Radbruch, E. Hamelmann, and R.A. Kroczeck, *Expression of ICOS in vivo defines CD4+ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10*. J Exp Med, 2003. **197**(2): p. 181-93.
63. Qi, H., J.L. Cannons, F. Klauschen, P.L. Schwartzberg, and R.N. Germain, *SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation*. Nature, 2008. **455**(7214): p. 764-9.
64. Vogelzang, A., H.M. McGuire, D. Yu, J. Sprent, C.R. Mackay, and C. King, *A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells*. Immunity, 2008. **29**(1): p. 127-37.
65. King, C., S.G. Tangye, and C.R. Mackay, *T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 741-66.
66. Gomez-Martin, D., M. Diaz-Zamudio, J. Romo-Tena, M.J. Ibarra-Sanchez, and J. Alcocer-Varela, *Follicular helper T cells poise immune responses to the development of autoimmune pathology*. Autoimmun Rev, 2011. **10**(6): p. 325-30.
67. Schaerli, P., P. Loetscher, and B. Moser, *Cutting edge: induction of follicular homing precedes effector Th cell development*. J Immunol, 2001. **167**(11): p. 6082-6.

68. Moser, B., P. Schaerli, and P. Loetscher, *CXCR5(+) T cells: follicular homing takes center stage in T-helper-cell responses*. Trends Immunol, 2002. **23**(5): p. 250-4.
69. Nurieva, R.I., Y. Chung, D. Hwang, X.O. Yang, H.S. Kang, L. Ma, Y.H. Wang, S.S. Watowich, A.M. Jetten, Q. Tian, and C. Dong, *Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages*. Immunity, 2008. **29**(1): p. 138-49.
70. Yu, D., M. Batten, C.R. Mackay, and C. King, *Lineage specification and heterogeneity of T follicular helper cells*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(6): p. 619-25.
71. Rasheed, A.U., H.P. Rahn, F. Sallusto, M. Lipp, and G. Muller, *Follicular B helper T cell activity is confined to CXCR5(hi)ICOS(hi) CD4 T cells and is independent of CD57 expression*. Eur J Immunol, 2006. **36**(7): p. 1892-903.
72. Kim, C.H., H.W. Lim, J.R. Kim, L. Rott, P. Hillsamer, and E.C. Butcher, *Unique gene expression program of human germinal center T helper cells*. Blood, 2004. **104**(7): p. 1952-60.
73. Ariga, H., H. Ohto, M.P. Busch, S. Imamura, R. Watson, W. Reed, and T.H. Lee, *Kinetics of fetal cellular and cell-free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: implications for noninvasive prenatal diagnosis*. Transfusion, 2001. **41**(12): p. 1524-30.
74. Kim, C.H., L.S. Rott, I. Clark-Lewis, D.J. Campbell, L. Wu, and E.C. Butcher, *Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells*. J Exp Med, 2001. **193**(12): p. 1373-81.
75. Bossaller, L., J. Burger, R. Draeger, B. Grimbacher, R. Knoth, A. Plebani, A. Durandy, U. Baumann, M. Schlesier, A.A. Welcher, H.H. Peter, and K. Warnatz, *ICOS deficiency is associated with a severe reduction of CXCR5+CD4 germinal center Th cells*. J Immunol, 2006. **177**(7): p. 4927-32.
76. Deenick, E.K. and C.S. Ma, *The regulation and role of T follicular helper cells in immunity*. Immunology, 2011. **134**(4): p. 361-7.
77. Chevalier, N., D. Jarrossay, E. Ho, D.T. Avery, C.S. Ma, D. Yu, F. Sallusto, S.G. Tangye, and C.R. Mackay, *CXCR5 expressing human central memory CD4 T cells and their relevance for humoral immune responses*. J Immunol, 2011. **186**(10): p. 5556-68.
78. Morita, R., N. Schmitt, S.E. Bentebibel, R. Ranganathan, L. Bourdery, G. Zurawski, E. Foucat, M. Dullaers, S. Oh, N. Sabzghabaei, E.M. Lavecchio, M. Punaro, V. Pascual, J. Banchereau, and H. Ueno, *Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion*. Immunity, 2011. **34**(1): p. 108-21.
79. Vukmanovic-Stejic, M., B. Vyas, P. Gorak-Stolinska, A. Noble, and D.M. Kemeny, *Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes*. Blood, 2000. **95**(1): p. 231-40.
80. Kondo, T., H. Takata, F. Matsuki, and M. Takiguchi, *Cutting edge: Phenotypic characterization and differentiation of human CD8+ T cells producing IL-17*. J Immunol, 2009. **182**(4): p. 1794-8.
81. Ortega, C., A.S. Fernandez, J.M. Carrillo, P. Romero, I.J. Molina, J.C. Moreno, and M. Santamaria, *IL-17-producing CD8+ T lymphocytes from psoriasis skin plaques are cytotoxic effector cells that secrete Th17-related cytokines*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(2): p. 435-43.

82. Maggi, L., V. Santarlasci, M. Capone, A. Peired, F. Frosali, S.Q. Crome, V. Querci, M. Fambrini, F. Liotta, M.K. Levings, E. Maggi, L. Cosmi, S. Romagnani, and F. Annunziato, *CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC*. Eur J Immunol, 2010. **40**(8): p. 2174-81.
83. Billerbeck, E., Y.H. Kang, L. Walker, H. Lockstone, S. Grafmueller, V. Fleming, J. Flint, C.B. Willberg, B. Bengsch, B. Seigel, N. Ramamurthy, N. Zitzmann, E.J. Barnes, J. Thevanayagam, A. Bhagwanani, A. Leslie, Y.H. Oo, S. Kollnberger, P. Bowness, O. Drognitz, D.H. Adams, H.E. Blum, R. Thimme, and P. Klenerman, *Analysis of CD161 expression on human CD8+ T cells defines a distinct functional subset with tissue-homing properties*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(7): p. 3006-11.
84. Kondelkova, K., D. Vokurkova, J. Krejsek, L. Borska, Z. Fiala, and A. Ctirad, *Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders*. Acta Medica (Hradec Kralove), 2010. **53**(2): p. 73-7.
85. Zhu, J. and W.E. Paul, *CD4 T cells: fates, functions, and faults*. Blood, 2008. **112**(5): p. 1557-69.
86. Davidson, A. and B. Diamond, *Autoimmune diseases*. N Engl J Med, 2001. **345**(5): p. 340-50.
87. Pernis, A.B., *Th17 cells in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus*. J Intern Med, 2009. **265**(6): p. 644-52.
88. Mesquita, D., W.M. Cruvinel, N.O.S. Camara, E.G. Kallas, and L.E.C. Andrade, *Autoimmune diseases in the TH17 era*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2009. **42**(6): p. 476-486.
89. Steinman, L., *A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage (vol 13, pg 139, 2007)*. Nature Medicine, 2007. **13**(3): p. 385-385.
90. Harrington, L.E., P.R. Mangan, and C.T. Weaver, *Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(3): p. 349-56.
91. Takatori, H., Y. Kanno, Z. Chen, and J.J. O'Shea, *New complexities in helper T cell fate determination and the implications for autoimmune diseases*. Modern Rheumatology, 2008. **18**(6): p. 533-41.
92. Komiyama, Y., S. Nakae, T. Matsuki, A. Nambu, H. Ishigame, S. Kakuta, K. Sudo, and Y. Iwakura, *IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2006. **177**(1): p. 566-73.
93. Nakae, S., A. Nambu, K. Sudo, and Y. Iwakura, *Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 6173-7.
94. Lubberts, E., M.I. Koenders, B. Oppers-Walgreen, L. van den Bersselaar, C.J. Coenen-de Roo, L.A. Joosten, and W.B. van den Berg, *Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion*. Arthritis and Rheumatism, 2004. **50**(2): p. 650-9.
95. Zhang, Z., M. Zheng, J. Bindas, P. Schwarzenberger, and J.K. Kolls, *Critical role of IL-17 receptor signaling in acute TNBS-induced colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2006. **12**(5): p. 382-8.
96. Kotake, S., N. Udagawa, N. Takahashi, K. Matsuzaki, K. Itoh, S. Ishiyama, S. Saito, K. Inoue, N. Kamatani, M.T. Gillespie, T.J. Martin, and T. Suda, *IL-17 in*



- synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis*. J Clin Invest, 1999. **103**(9): p. 1345-52.
97. Ziolkowska, M., A. Koc, G. Luszczkiewicz, K. Ksiezopolska-Pietrzak, E. Klimczak, H. Chwalinska-Sadowska, and W. Maslinski, *High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism*. J Immunol, 2000. **164**(5): p. 2832-8.
  98. Chabaud, M., J.M. Durand, N. Buchs, F. Fossiez, G. Page, L. Frappart, and P. Miossec, *Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium*. Arthritis and Rheumatism, 1999. **42**(5): p. 963-70.
  99. Chabaud, M., E. Lubberts, L. Joosten, W. van Den Berg, and P. Miossec, *IL-17 derived from juxta-articular bone and synovium contributes to joint degradation in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res, 2001. **3**(3): p. 168-77.
  100. Van Bezooijen, R.L., L. Van Der Wee-Pals, S.E. Papapoulos, and C.W. Lowik, *Interleukin 17 synergises with tumour necrosis factor alpha to induce cartilage destruction in vitro*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2002. **61**(10): p. 870-6.
  101. Leipe, J., M. Grunke, C. Dechant, C. Reindl, U. Kerzendorf, H. Schulze-Koops, and A. Skapenko, *Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis*. Arthritis and Rheumatism, 2010. **62**(10): p. 2876-85.
  102. Matusevicius, D., P. Kivisakk, B. He, N. Kostulas, V. Ozenci, S. Fredrikson, and H. Link, *Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis*. Mult Scler, 1999. **5**(2): p. 101-4.
  103. Lock, C., G. Hermans, R. Pedotti, A. Brendolan, E. Schadt, H. Garren, A. Langer-Gould, S. Strober, B. Cannella, J. Allard, P. Klonowski, A. Austin, N. Lad, N. Kaminski, S.J. Galli, J.R. Oksenberg, C.S. Raine, R. Heller, and L. Steinman, *Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis*. Nat Med, 2002. **8**(5): p. 500-8.
  104. Kebir, H., K. Kreymborg, I. Ifergan, A. Dodelet-Devillers, R. Cayrol, M. Bernard, F. Giuliani, N. Arbour, B. Becher, and A. Prat, *Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation*. Nat Med, 2007. **13**(10): p. 1173-5.
  105. Tzartos, J.S., M.A. Friese, M.J. Craner, J. Palace, J. Newcombe, M.M. Esiri, and L. Fugger, *Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis*. Am J Pathol, 2008. **172**(1): p. 146-55.
  106. Garrett-Sinha, L.A., S. John, and S.L. Gaffen, *IL-17 and the Th17 lineage in systemic lupus erythematosus*. Current Opinion in Rheumatology, 2008. **20**(5): p. 519-25.
  107. Wong, C.K., C.Y. Ho, E.K. Li, and C.W. Lam, *Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus*. Lupus, 2000. **9**(8): p. 589-93.
  108. Wong, C.K., L.C. Lit, L.S. Tam, E.K. Li, P.T. Wong, and C.W. Lam, *Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity*. Clin Immunol, 2008. **127**(3): p. 385-93.
  109. Henriques, A., L. Ines, M. Couto, S. Pedreiro, C. Santos, M. Magalhaes, P. Santos, I. Velada, A. Almeida, T. Carneiro, P. Laranjeira, J.M. Morgado, M.L. Pais, J.A. da Silva, and A. Paiva, *Frequency and functional activity of Th17, Tc17 and other*

- T-cell subsets in Systemic Lupus Erythematosus*. Cell Immunol, 2010. **264**(1): p. 97-103.
110. Afzali, B., G. Lombardi, R.I. Lechler, and G.M. Lord, *The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease*. Clin Exp Immunol, 2007. **148**(1): p. 32-46.
  111. Wang, T., Y. Zhao, X. Liu, R. Li, L.M. Ren, H. Ye, and Z.G. Li, *[Possible mechanisms of peripheral elevated CD8+ IL-17+ T cells in rheumatoid arthritis]*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2009. **89**(27): p. 1885-8.
  112. Vinuesa, C.G., M.C. Cook, C. Angelucci, V. Athanasopoulos, L. Rui, K.M. Hill, D. Yu, H. Domaschensz, B. Whittle, T. Lambe, I.S. Roberts, R.R. Copley, J.I. Bell, R.J. Cornall, and C.C. Goodnow, *A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity*. Nature, 2005. **435**(7041): p. 452-8.
  113. Hutloff, A., K. Buchner, K. Reiter, H.J. Baelde, M. Odendahl, A. Jacobi, T. Dorner, and R.A. Kroczeck, *Involvement of inducible costimulator in the exaggerated memory B cell and plasma cell generation in systemic lupus erythematosus*. Arthritis and Rheumatism, 2004. **50**(10): p. 3211-20.
  114. Simpson, N., P.A. Gatenby, A. Wilson, S. Malik, D.A. Fulcher, S.G. Tangye, H. Manku, T.J. Vyse, G. Roncador, G.A. Huttley, C.C. Goodnow, C.G. Vinuesa, and M.C. Cook, *Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus*. Arthritis and Rheumatism, 2010. **62**(1): p. 234-44.
  115. Li, X.Y., Z.B. Wu, J. Ding, Z.H. Zheng, L.N. Chen, and P. Zhu, *Role of the frequency of blood CD4(+) CXCR5(+) CCR6(+) T cells in autoimmunity in patients with Sjogren's syndrome*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **422**(2): p. 238-44.
  116. Katsumoto, T.R., M.L. Whitfield, and M.K. Connolly, *The pathogenesis of systemic sclerosis*. Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 509-37.
  117. Steen, V.D. and T.A. Medsger, Jr., *Severe organ involvement in systemic sclerosis with diffuse scleroderma*. Arthritis and Rheumatism, 2000. **43**(11): p. 2437-44.
  118. Derk, C.T. and S.A. Jimenez, *Systemic sclerosis: current views of its pathogenesis*. Autoimmun Rev, 2003. **2**(4): p. 181-91.
  119. Steen, V.D. and T.A. Medsger, *Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972-2002*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2007. **66**(7): p. 940-4.
  120. Gu, Y.S., J. Kong, G.S. Cheema, C.L. Keen, G. Wick, and M.E. Gershwin, *The immunobiology of systemic sclerosis*. Semin Arthritis Rheum, 2008. **38**(2): p. 132-60.
  121. Chiffot, H., B. Fautrel, C. Sordet, E. Chatelus, and J. Sibilia, *Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review*. Semin Arthritis Rheum, 2008. **37**(4): p. 223-35.
  122. Ranque, B. and L. Mouthon, *Geoepidemiology of systemic sclerosis*. Autoimmun Rev, 2010. **9**(5): p. A311-8.
  123. Walker, U.A., A. Tyndall, L. Czirjak, C.P. Denton, D. Farge-Bancel, O. Kowal-Bielecka, U. Muller-Ladner, and M. Matucci-Cerinic, *Geographical variation of disease manifestations in systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) group database*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2009. **68**(6): p. 856-62.

124. Derrett-Smith, E.C. and C.P. Denton, *Systemic sclerosis: clinical features and management*. Medicine, 2010. **38**(2): p. 109-115.
125. Clements, P., P. Lachenbruch, J. Siebold, B. White, S. Weiner, R. Martin, A. Weinstein, M. Weisman, M. Mayes, D. Collier, and et al., *Inter and intraobserver variability of total skin thickness score (modified Rodnan TSS) in systemic sclerosis*. Journal of Rheumatology, 1995. **22**(7): p. 1281-5.
126. Hachulla, E. and D. Launay, *Diagnosis and classification of systemic sclerosis*. Clin Rev Allergy Immunol, 2011. **40**(2): p. 78-83.
127. Geyer, M. and U. Muller-Ladner, *The pathogenesis of systemic sclerosis revisited*. Clin Rev Allergy Immunol, 2011. **40**(2): p. 92-103.
128. Allamore, Y., J. Wipff, A. Kahan, and C. Boileau, *Genetic basis for systemic sclerosis*. Joint Bone Spine, 2007. **74**(6): p. 577-83.
129. Frech, T., D. Khanna, B. Markewitz, G. Mineau, R. Pimentel, and A. Sawitzke, *Heritability of vasculopathy, autoimmune disease, and fibrosis in systemic sclerosis: a population-based study*. Arthritis and Rheumatism, 2010. **62**(7): p. 2109-16.
130. Feghali-Bostwick, C., T.A. Medsger, Jr., and T.M. Wright, *Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies*. Arthritis and Rheumatism, 2003. **48**(7): p. 1956-63.
131. McCormic, Z.D., S.S. Khuder, B.K. Aryal, A.L. Ames, and S.A. Khuder, *Occupational silica exposure as a risk factor for scleroderma: a meta-analysis*. Int Arch Occup Environ Health, 2010. **83**(7): p. 763-9.
132. Aryal, B.K., S.A. Khuder, and E.A. Schaub, *Meta-analysis of systemic sclerosis and exposure to solvents*. Am J Ind Med, 2001. **40**(3): p. 271-4.
133. Grossman, C., Z. Dovrish, Y. Shoenfeld, and H. Amital, *Do infections facilitate the emergence of systemic sclerosis?* Autoimmun Rev, 2011. **10**(5): p. 244-7.
134. Ohtsuka, T. and S. Yamazaki, *Increased prevalence of human parvovirus B19 DNA in systemic sclerosis skin*. Br J Dermatol, 2004. **150**(6): p. 1091-5.
135. Ferri, C., K. Zakrzewska, G. Longombardo, D. Giuggioli, F.A. Storino, G. Pasero, and A. Azzi, *Parvovirus B19 infection of bone marrow in systemic sclerosis patients*. Clinical and Experimental Rheumatology, 1999. **17**(6): p. 718-20.
136. Ferri, C., M. Cazzato, D. Giuggioli, M. Sebastiani, and C. Magro, *Systemic sclerosis following human cytomegalovirus infection*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2002. **61**(10): p. 937-8.
137. Kalabay, L., B. Fekete, L. Czirjak, L. Horvath, M.R. Daha, A. Veres, G. Fonyad, A. Horvath, A. Viczian, M. Singh, I. Hoffer, G. Fust, L. Romics, and Z. Prohaszka, *Helicobacter pylori infection in connective tissue disorders is associated with high levels of antibodies to mycobacterial hsp65 but not to human hsp60*. Helicobacter, 2002. **7**(4): p. 250-6.
138. Artlett, C.M., J.B. Smith, and S.A. Jimenez, *Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis*. N Engl J Med, 1998. **338**(17): p. 1186-91.
139. Nelson, J.L., D.E. Furst, S. Maloney, T. Gooley, P.C. Evans, A. Smith, M.A. Bean, C. Ober, and D.W. Bianchi, *Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma*. Lancet, 1998. **351**(9102): p. 559-62.

140. Leduc, M., S. Aractingi, and K. Khosrotehrani, *Fetal-cell microchimerism, lymphopoiesis, and autoimmunity*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2009. **57**(5): p. 325-9.
141. Tamby, M.C., Y. Chanseaud, L. Guillevin, and L. Mouthon, *New insights into the pathogenesis of systemic sclerosis*. Autoimmun Rev, 2003. **2**(3): p. 152-7.
142. Randone, S.B., S. Guiducci, and M.M. Cerinic, *Systemic sclerosis and infections*. Autoimmun Rev, 2008. **8**(1): p. 36-40.
143. Botzoris, V. and A.A. Drosos, *Management of Raynaud's phenomenon and digital ulcers in systemic sclerosis*. Joint Bone Spine, 2011. **78**(4): p. 341-6.
144. Galluccio, F. and M. Matucci-Cerinic, *Two faces of the same coin: Raynaud phenomenon and digital ulcers in systemic sclerosis*. Autoimmun Rev, 2011. **10**(5): p. 241-3.
145. Cerinic, M.M., G. Valentini, G.G. Sorano, S. D'Angelo, G. Cuomo, L. Fenu, S. Generini, S. Cinotti, M. Morfini, A. Pignone, S. Guiducci, A. Del Rosso, R. Kalfin, D. Das, and F. Marongiu, *Blood coagulation, fibrinolysis, and markers of endothelial dysfunction in systemic sclerosis*. Semin Arthritis Rheum, 2003. **32**(5): p. 285-95.
146. Matucci-Cerinic, M., U. Pietrini, and S. Marabini, *Local venomotor response to intravenous infusion of substance P and glyceryl trinitrate in systemic sclerosis*. Clinical and Experimental Rheumatology, 1990. **8**(6): p. 561-5.
147. Scheja, A., A. Akesson, P. Geborek, M. Wildt, C.B. Wollheim, F.A. Wollheim, and U.M. Vischer, *Von Willebrand factor propeptide as a marker of disease activity in systemic sclerosis (scleroderma)*. Arthritis Res, 2001. **3**(3): p. 178-82.
148. Hussein, M.R., H.I. Hassan, E.R. Hofny, M. Elkholy, N.A. Fatehy, A.E. Abd Elmoniem, A.M. Ezz El-Din, O.A. Afifi, and H.G. Rashed, *Alterations of mononuclear inflammatory cells, CD4/CD8+ T cells, interleukin 1beta, and tumour necrosis factor alpha in the bronchoalveolar lavage fluid, peripheral blood, and skin of patients with systemic sclerosis*. J Clin Pathol, 2005. **58**(2): p. 178-84.
149. Gustafsson, R., T.H. Totterman, L. Klareskog, and R. Hallgren, *Increase in activated T cells and reduction in suppressor inducer T cells in systemic sclerosis*. Annals of the Rheumatic Diseases, 1990. **49**(1): p. 40-5.
150. Sakkas, L.I. and C.D. Platsoucas, *Is systemic sclerosis an antigen-driven T cell disease?* Arthritis and Rheumatism, 2004. **50**(6): p. 1721-33.
151. Chizzolini, C., Y. Parel, C. De Luca, A. Tyndall, A. Akesson, A. Scheja, and J.M. Dayer, *Systemic sclerosis Th2 cells inhibit collagen production by dermal fibroblasts via membrane-associated tumor necrosis factor alpha*. Arthritis and Rheumatism, 2003. **48**(9): p. 2593-604.
152. Mavalia, C., C. Scaletti, P. Romagnani, A.M. Carossino, A. Pignone, L. Emmi, C. Pupilli, G. Pizzolo, E. Maggi, and S. Romagnani, *Type 2 helper T-cell predominance and high CD30 expression in systemic sclerosis*. Am J Pathol, 1997. **151**(6): p. 1751-8.
153. Atamas, S.P. and B. White, *Cytokine regulation of pulmonary fibrosis in scleroderma*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(6): p. 537-50.
154. Hetzel, M., M. Bachem, D. Anders, G. Trischler, and M. Faehling, *Different effects of growth factors on proliferation and matrix production of normal and fibrotic human lung fibroblasts*. Lung, 2005. **183**(4): p. 225-37.
155. Ghosh, A.K., W. Yuan, Y. Mori, S. Chen, and J. Varga, *Antagonistic regulation of type I collagen gene expression by interferon-gamma and transforming growth*

- factor-beta. Integration at the level of p300/CBP transcriptional coactivators.* J Biol Chem, 2001. **276**(14): p. 11041-8.
156. Chizzolini, C., R. Rezzonico, C. Ribbens, D. Burger, F.A. Wollheim, and J.M. Dayer, *Inhibition of type I collagen production by dermal fibroblasts upon contact with activated T cells: different sensitivity to inhibition between systemic sclerosis and control fibroblasts.* Arthritis and Rheumatism, 1998. **41**(11): p. 2039-47.
  157. Abraham, D.J., T. Krieg, J. Distler, and O. Distler, *Overview of pathogenesis of systemic sclerosis.* Rheumatology (Oxford), 2009. **48 Suppl 3**: p. iii3-7.
  158. Dong, C., S. Zhu, T. Wang, W. Yoon, Z. Li, R.J. Alvarez, P. ten Dijke, B. White, F.M. Wigley, and P.J. Goldschmidt-Clermont, *Deficient Smad7 expression: a putative molecular defect in scleroderma.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(6): p. 3908-13.
  159. Leask, A., *Scar wars: is TGFbeta the phantom menace in scleroderma?* Arthritis Res Ther, 2006. **8**(4): p. 213.
  160. Radstake, T.R., L. van Bon, J. Broen, A. Hussiani, R. Hesselstrand, D.M. Wuttge, Y. Deng, R. Simms, E. Lubberts, and R. Lafyatis, *The pronounced Th17 profile in systemic sclerosis (SSc) together with intracellular expression of TGFbeta and IFNgamma distinguishes SSc phenotypes.* PLoS One, 2009. **4**(6): p. e5903.
  161. Rodriguez-Reyna, T.S., J. Furuzawa-Carballeda, J. Cabiedes, L.D. Fajardo-Hermosillo, C. Martinez-Reyes, M. Diaz-Zamudio, and L. Llorente, *Th17 peripheral cells are increased in diffuse cutaneous systemic sclerosis compared with limited illness: a cross-sectional study.* Rheumatol Int, 2011.
  162. Kurasawa, K., K. Hirose, H. Sano, H. Endo, H. Shinkai, Y. Nawata, K. Takabayashi, and I. Iwamoto, *Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis.* Arthritis and Rheumatism, 2000. **43**(11): p. 2455-63.
  163. Murata, M., M. Fujimoto, T. Matsushita, Y. Hamaguchi, M. Hasegawa, K. Takehara, K. Komura, and S. Sato, *Clinical association of serum interleukin-17 levels in systemic sclerosis: is systemic sclerosis a Th17 disease?* J Dermatol Sci, 2008. **50**(3): p. 240-2.
  164. Fenoglio, D., F. Battaglia, A. Parodi, S. Stringara, S. Negrini, N. Panico, M. Rizzi, F. Kalli, G. Conteduca, M. Ghio, R. De Palma, F. Indiveri, and G. Filaci, *Alteration of Th17 and Treg cell subpopulations co-exist in patients affected with systemic sclerosis.* Clin Immunol, 2011. **139**(3): p. 249-57.
  165. Truchetet, M.E., N.C. Brembilla, E. Montanari, Y. Allanore, and C. Chizzolini, *Increased frequency of circulating Th22 in addition to Th17 and Th2 lymphocytes in systemic sclerosis: association with interstitial lung disease.* Arthritis Res Ther, 2011. **13**(5): p. R166.
  166. *Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee.* Arthritis and Rheumatism, 1980. **23**(5): p. 581-90.
  167. LeRoy, E.C., C. Black, R. Fleischmajer, S. Jablonska, T. Krieg, T.A. Medsger, Jr., N. Rowell, and F. Wollheim, *Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis.* Journal of Rheumatology, 1988. **15**(2): p. 202-5.
  168. Corriveau, M.P., I. Boufaied, J. Lessard, S. Chabaud, J.L. Senecal, T. Grodzicky, S. Chartier, Y. Raymond, and V.J. Moulin, *The fibrotic phenotype of systemic sclerosis fibroblasts varies with disease duration and severity of skin involvement:*

- reconstitution of skin fibrosis development using a tissue engineering approach.* J Pathol, 2009. **217**(4): p. 534-42.
169. Roark, C.L., J.D. French, M.A. Taylor, A.M. Bendele, W.K. Born, and R.L. O'Brien, *Exacerbation of collagen-induced arthritis by oligoclonal, IL-17-producing gamma delta T cells.* J Immunol, 2007. **179**(8): p. 5576-83.
  170. Sutton, C.E., S.J. Lalor, C.M. Sweeney, C.F. Brereton, E.C. Lavelle, and K.H. Mills, *Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity.* Immunity, 2009. **31**(2): p. 331-41.
  171. Coquet, J.M., S. Chakravarti, K. Kyparissoudis, F.W. McNab, L.A. Pitt, B.S. McKenzie, S.P. Berzins, M.J. Smyth, and D.I. Godfrey, *Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(32): p. 11287-92.
  172. Gourh, P., F.C. Arnett, S. Assassi, F.K. Tan, M. Huang, L. Diekman, M.D. Mayes, J.D. Reveille, and S.K. Agarwal, *Plasma cytokine profiles in systemic sclerosis: associations with autoantibody subsets and clinical manifestations.* Arthritis Res Ther, 2009. **11**(5): p. R147.
  173. Nistala, K., S. Adams, H. Cambrook, S. Ursu, B. Olivito, W. de Jager, J.G. Evans, R. Cimaz, M. Bajaj-Elliott, and L.R. Wedderburn, *Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(33): p. 14751-6.
  174. Matsushita, T., M. Hasegawa, Y. Hamaguchi, K. Takehara, and S. Sato, *Longitudinal analysis of serum cytokine concentrations in systemic sclerosis: association of interleukin 12 elevation with spontaneous regression of skin sclerosis.* Journal of Rheumatology, 2006. **33**(2): p. 275-84.
  175. Croft, M. and S.L. Swain, *B cell response to fresh and effector T helper cells. Role of cognate T-B interaction and the cytokines IL-2, IL-4, and IL-6.* J Immunol, 1991. **146**(12): p. 4055-64.
  176. Forman, M.S. and E. Pure, *T-independent and T-dependent B lymphoblasts: helper T cells prime for interleukin 2-induced growth and secretion of immunoglobulins that utilize downstream heavy chains.* J Exp Med, 1991. **173**(3): p. 687-97.
  177. Davies, K.A., M.G. Robson, A.M. Peters, P. Norsworthy, J.T. Nash, and M.J. Walport, *Defective Fc-dependent processing of immune complexes in patients with systemic lupus erythematosus.* Arthritis and Rheumatism, 2002. **46**(4): p. 1028-38.